

**Claudia Kristen-Burmann**

---

Das Virus der porzinen epidemischen Diarrhö:  
Charakterisierung mittels reverser Genetik



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Virologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Gergely Tekes

# **Das Virus der porzinen epidemischen Diarrhö: Charakterisierung mittels reverser Genetik**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Claudia Kristen-Burmann**

Tierärztin aus Wetzlar (Deutschland)

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Gergely Tekes
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 23.11.2018



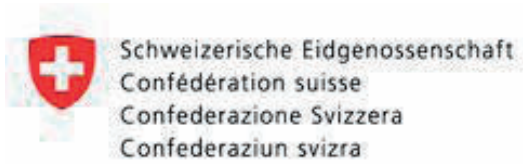
Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Claudia Kristen-Burmann

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Forschungsprojekt handelte es sich um eine Kooperation mit dem Institut für Virologie und Immunologie, Vetsuisse-Fakultät Bern, Schweiz. Alle durchgeführten Tierversuche (Genehmigungsnummer BE125/16, Veterinäramt des Kantons Bern) fanden unter Leitung von Prof. Dr. Volker Thiel sowie Dr. Nicolas Ruggli am Institut für Virologie und Immunologie, Mittelhäusern, Schweiz, unter Mitwirkung der Autorin statt. Die gesamte Aufarbeitung und qRT-PCR-Analyse der entnommenen Proben wurde von Peter Rogger unter Mithilfe von Hanspeter Stalder, Institut für Virologie und Immunologie, Bern/Mittelhäusern, Schweiz, durchgeführt. Die pathologische und histopathologische Untersuchung erfolgte durch Inês Veiga und Prof. Dr. Horst Posthaus, Institut für Tierpathologie, Bern, Schweiz. Die aus diesen Untersuchungen resultierenden Ergebnisse sind entsprechend gekennzeichnet.

Claudia Kristen-Burmann



**Bundesamt für Lebensmittelsicherheit  
und Veterinärwesen**

Diese Arbeit wurde durch das schweizerische Bundesamt für  
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen gefördert.

Meinen Eltern,  
meinem Mausbär  
und meinem Mori  
gewidmet.

## Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt an erster Stelle **Prof. Dr. Gergely Tekes** für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor zu absolvieren und die hervorragende Betreuung und Unterstützung des Projekts. Ohne seinen nie endenden Ideenreichtum und diverse erfolbringende Backup-Pläne, während ich schon nicht mehr an eine Realisierung des Projekts glaubte, wäre eine Verwirklichung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso danke ich **Prof. Dr. Volker Thiel** für die Möglichkeit der Mitarbeit an einer internationalen Kooperation und der Teilnahme an den Tierexperimenten in Mittelhäusern. Die Forschungsaufenthalte in der Schweiz waren sowohl aus beruflicher als auch privater Sicht eine wertvolle und interessante Erfahrung und haben meinen Horizont erweitert.

Herrn **Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel** danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Empfehlung an Prof. Dr. Tekes.

Ein großes Dankeschön gebührt allen Personen, die an der Durchführung der Tierexperimente in der Schweiz beteiligt waren. Insbesondere danke ich **Peter Rogger** für die sehr nette Betreuung während meines Aufenthaltes in Bern und vor allem für die viele Arbeit zur Vorbereitung der Experimente sowie Bearbeitung und Auswertung der Proben. Ebenso bedanken möchte ich mich bei **Hanspeter Stalder**, der das Projekt durch zahlreiche Sequenzanalysen und die Planung und Erstellung von qRT-PCR-Protokollen vorangebracht hat und immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte. Den Pathologen **Inês Veiga** und **Prof. Dr. Horst Posthaus** danke ich für die Durchführung der Sektionen zu den unmöglichsten Zeiten und die Aufarbeitung der zahlreichen histopathologischen Proben. Außerdem bedanke ich mich bei **Dr. Nicolas Ruggli**, **Julie Rappe**, **Dänu Brechbühl** und **Veronika Ayala** für die liebevolle Betreuung der Ferkel, ihr Engagement bei der Planung und Durchführung der Versuche sowie die herzliche Aufnahme und Betreuung in Mittelhäusern!

Weiterhin möchte ich mich bei **Prof. Dr. Mathias Ackermann** und **Kurt Tobler** für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und die Beantwortung diverser Fragen bedanken.

**Dr. Ramakanth Madhugiri** danke ich für die Hilfe bei der Erstellung und Analyse von Sekundärstrukturen in der 5'UTR.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Virologie in Gießen, insbesondere an meine Laborkollegen **Rosina Ehmann** (Vielen Dank für deine Hilfe und Ideen bei allen Problemen im Labor, deine Unterstützung beim Pipettieren von IVTs, Vorbereiten von Zellen und Ernten von Viren wenn Not am Mann war und deine Aufmunterungsversuche wenn mal wieder etwas nicht funktioniert hat. Ohne dich hätte ich

die letzten Jahre nicht überstanden! :-)), **Dominik Florek** (Dankeschön für den Spaß den du ins Labor gebracht hast, z. B. beim Bauen von Trockeneisbömbchen und Geschichtenerzählen. Danke für die Hilfe bei Western Blots und natürlich für das Ansetzen des MOPS-Puffers! ;-)), **Giulia Dowgier** (Thanks a lot for your happy and Italian way of life and the laughter you brought into our office! And a big thank you for the nice time we spent in Italy, which helped me to gain power for the last step of the thesis! It's time for a revival!), **Anette Netsch** (Vielen Dank für deine Arbeit im Labor und dein Engagement bei der Klärung aller erdenklichen Fragen sowie für deine trockene und erheiternde Art!), **Lisa Fischer** (Danke für deine positive Art, insbesondere in den letzten Monaten, deine Hilfe und vor allem deine leckeren Kuchen!) und **Stefanie Riebesehl** (Vielen Dank für die engagierte Fortführung des Projekts, deine Hilfe bei den letzten Versuchen und deine sympathische und entspannte Art!).

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei **meinen Eltern**, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben und ohne die ich heute nicht dort wäre, wo ich bin. Danke für eure Hilfe in jeglicher Hinsicht und für eure Geduld beim Warten auf potentielle Enkelkinder!

An letzter Stelle geht ein riesengroßes Dankeschön an meinen Mann **Sebastian Burmann**. Danke dafür, dass du immer zu mir gehalten hast, auch wenn es mal schwierig wurde und mich immer wieder aufgerichtet und mit deinen „langweiligen Arbeits- und T4-Geschichten“ erheitert hast, wenn alles schief lief. Und natürlich für die Zeiten, als du im Auto auf mich gewartet hast während ich im Labor war oder du dir zum tausendsten Mal etwas über das „PEDV genome“ anhören musstest.

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

### **Vorträge:**

Kristen-Burmann C., Ehmann R., Ackermann M., Thiel V. and Tekes G.

Modification of the spike gene attenuates highly virulent porcine epidemic diarrhea virus in piglets

*-10<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 2017*

### **Poster:**

Kristen-Burmann C., Ehmann R., Ackermann M., Thiel V. and Tekes G.

Porcine Epidemic Diarrhea – on the hunt for its molecular pathogenesis

*- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Marburg, 2017*

Kristen-Burmann C., Rogger P., Ehmann R., Rappe J., Stalder H., Posthaus H., Veiga I., Ruggli N., Ackermann M., Thiel V. and Tekes G.

Modification of the spike gene attenuates highly virulent porcine epidemic diarrhea virus in piglets

*- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Würzburg, 2018*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Coronaviren .....	1
1.1.1 Taxonomie .....	2
1.1.2 Morphologie .....	4
1.1.3 Genomorganisation .....	6
1.1.4 Der coronavirale Replikationszyklus .....	8
1.2 Das Virus der porzinen epidemischen Diarrhö (PEDV) .....	13
1.2.1 Klinik und Pathogenese der PED .....	13
1.2.2 Epidemiologie der PED .....	15
1.2.2.1 Zeitliche und räumliche Verbreitung der PED.....	15
1.2.2.2 Globale Evolution von PEDV-Stämmen .....	18
1.2.3 Virulenzfaktoren von PEDV .....	20
1.2.3.1 Das PEDV S-Protein.....	20
1.2.3.2 Das akzessorische Protein 3.....	22
1.2.4 Zellkulturpropagation von PEDV.....	22
1.2.5 PEDV-Vakzinen.....	23
1.2.6 Reverse Genetik bei PEDV .....	25
1.2.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	26
<b>2 Material &amp; Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Material.....	28
2.1.1 Zellen .....	28
2.1.1.1 Eukaryotische Zellen.....	28
2.1.1.2 Prokaryotische Zellen.....	28
2.1.2 Viren.....	28
2.1.3 Plasmide .....	28
2.1.4 Enzyme .....	29
2.1.5 Antikörper.....	30
2.1.5.1 Primärantikörper .....	30
2.1.5.2 Sekundärantikörper.....	30
2.1.6 Chemikalien .....	30

2.1.7 Kits .....	32
2.1.8 Nährmedien.....	33
2.1.8.1 Bakterienkulturmedien .....	33
2.1.8.2 Zellkulturmedien.....	33
2.1.8.3 Zellkulturzusätze .....	33
2.1.8.4 Zellkulturzusätze für das revers-genetische System.....	34
2.1.8.5 Nährmediumzusammensetzung für die einzelnen Zelllinien .....	34
2.1.9 Lösungen und Puffer .....	34
2.1.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer .....	34
2.1.9.2 Lösungen und Puffer für Agarosegelelektrophorese .....	34
2.1.9.3 Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung und –Aufreinigung .....	35
2.1.9.4 Lösungen und Puffer für indirekte Immunfluoreszenz.....	35
2.1.9.5 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot .....	35
2.1.9.6 Medien und Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
2.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.11 Geräte .....	36
2.1.13 Synthetische DNA-Oligonukleotide.....	38
2.1.13.1 Oligonukleotide für die Erstellung von Selektionsplasmiden.....	38
2.1.13.2 Oligonukleotide zur Überprüfung der Selektionen .....	40
2.1.13.3 Oligonukleotide zur Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung rekombinanter Vacciniaviren.....	41
2.1.13.4 Oligonukleotide für die RT-PCR und 5'-RACE-PCR .....	42
2.1.13.5 Oligonukleotide für die Amplifizierung der N <sub>MN</sub> -Sequenz .....	43
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	43
2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	43
2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	43
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung .....	44
2.2.1.4 Infektion von Zellen .....	44
2.2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Nukleinsäuren .....	44
2.2.1.5.1 Chemische Transfektion .....	44
2.2.1.5.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation) .....	45
2.2.1.6 Generierung einer Zelllinie, die das N-Protein von PEDV MN induzierbar exprimiert.....	45
2.2.1.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot zur Erfolgskontrolle nach Erstellung einer BHK-PEDV <sub>MN</sub> -N-Zelllinie .....	46
2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz .....	47
2.2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen.....	47



2.2.2.1 Anzucht von Bakterien .....	47
2.2.2.2. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> HB101 K-12 .....	48
2.2.2.3 Transformation.....	48
2.2.3 Arbeiten mit DNA.....	48
2.2.3.1 Standardmethoden .....	48
2.2.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese .....	49
2.2.3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	50
2.2.3.1.4 Dephosphorylierung .....	50
2.2.3.1.5 Ligation.....	50
2.2.3.1.6 Klonierung .....	51
2.2.3.2 Isolierung von DNA .....	51
2.2.3.2.1 Plasmid-DNA-Präparation aus prokaryotischen Zellen .....	51
2.2.3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	51
2.2.3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	51
2.2.3.2.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen .....	51
2.2.3.2.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im analytischen Maßstab .....	51
2.2.3.2.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im präparativen Maßstab .....	52
2.2.3.3 Reinigung von DNA.....	52
2.2.3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation .....	52
2.2.3.4 DNA-Analyse .....	53
2.2.3.4.1 Agarosegelelektrophorese.....	53
2.2.3.4.2 Sanger-Sequenzierung.....	53
2.2.3.4.3 Bioinformatische Datenauswertung .....	53
2.2.4 Arbeiten mit RNA.....	53
2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen .....	53
2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen .....	54
2.2.4.3 Reverse-Transkriptase-PCR .....	54
2.2.4.4 <i>In-vitro</i> -Transkription (IVT) .....	54
2.2.4.5 Agarosegelelektrophorese von RNA .....	55
2.2.4.6 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) .....	55
2.2.5 Arbeiten mit Viren.....	56
2.2.5.1 Porzine Coronaviren .....	56
2.2.5.1.1 Titerbestimmung.....	56
2.2.5.1.2 Wachstumskurven .....	56
2.2.5.2 Vacciniaviren.....	57
2.2.5.2.1 Generierung rekombinanter Vacciniaviren .....	57

2.2.5.2.2 Positivselektion.....	57
2.2.5.2.3 Negativselektion .....	57
2.2.5.3 Genereller Ablauf zur Herstellung rekombinanter Coronaviren („ <i>Rescue</i> “) .....	59
2.2.6 Herstellung im Rahmen dieser Arbeit verwendeter vrecPEDVs und recPEDVs .....	59
2.2.6.1 Verwendete Plasmide, Ausgangs-Vacciniaviren, entstandene Vacciniaviren und daraus resultierende recPEDVs .....	59
2.2.8 Experimentelle Infektion von SPF-Ferkeln.....	63
2.2.8.1 Infektion von Ferkeln mit rekombinanten PEDVs .....	63
2.2.8.2 Probenauswertung .....	63
<b>3 Ergebnisse</b> .....	65
3.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für PEDV Minnesota.....	65
3.1.1 Einführung der kompletten PEDV-Stamm-MN-cDNA in das Vacciniavirusgenom.....	65
3.1.1.1 Herstellung der Selektionsplasmide zur Generierung von vrecPEDV-MN .....	65
3.1.1.2 Generierung von vrecPEDV-MN .....	66
3.1.2 Herstellung einer BHK-Zelllinie, die das N-Protein von PEDV MN induzierbar exprimiert .....	69
3.1.3 Herstellung von <i>in-vitro</i> -transkribierter PEDV-MN-RNA und Elektroporation in BHK- PEDV <sub>MN</sub> -N-Zellen .....	70
3.2 Substitution von S <sub>MN</sub> in vrecPEDV-MN durch das S-Gen des zellkulturadaptierten Stammes CV777 .....	71
3.3 Herstellung rekombinanter PEDVs mit S <sub>CV777</sub> durch Austausch der 5'UTR <sub>MN</sub> gegen 5'UTR <sub>CV777</sub> .....	74
3.3.1 Herstellung eines recPEDV mit 5'UTR <sub>CV777</sub> und S <sub>CV777</sub> .....	74
3.3.2 Identifizierung von Nukleotiden in der 5'UTR, welche für eine erfolgreiche Herstellung rekombinanter PEDVs essentiell sind.....	76
3.4 Untersuchung des Einflusses von ORF3 auf den <i>Rescue</i> rekombinanter PEDVs .....	80
3.5 Einfluss von S <sub>MN</sub> auf die Herstellung und <i>In-vitro</i> -Kultivierung rekombinanter PEDVs .....	82
3.6 Herstellung rekombinanter PEDVs mit S <sub>MN</sub> durch Einführung spezifischer Mutationen.....	84
3.6.1 Aminosäuredifferenzen zwischen S <sub>MN</sub> und dem S-Protein <i>in-vitro</i> -kultivierbarer Feldstämme .....	84
3.6.2 Identifizierung von Aminosäuren im S-Protein mit Einfluss auf einen erfolgreichen <i>Rescue</i> und die <i>In-vitro</i> -Kultivierung rekombinanter PEDVs .....	85
3.6.3 Exakte Bestimmung der für <i>Rescue/In-vitro</i> -Kultivierung von recPEDVs essentiellen Aminosäuren .....	87
3.7 Herstellung rekombinanter PEDVs für <i>In-vivo</i> -Experimente .....	89
3.7.1 Generierung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> .....	90
3.7.2 Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> .....	92
3.7.3 Herstellung eines recPEDV mit einer Deletion in ORF3 zur Untersuchung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV .....	93
3.8 Infektion von Ferkeln mit recPEDVs.....	94

3.8.1 Untersuchung des Einflusses des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV <i>in vivo</i> ..	94
3.8.1.1 Klinische Beurteilung nach Infektion von Ferkeln mit recPEDVs mit unterschiedlichen S-Genen.....	95
3.8.1.2 Pathologische und histopathologische Untersuchung infizierter Ferkel .....	96
3.8.1.3 Untersuchung des Virusgehaltes in Tupfer- und Blutproben.....	99
3.8.1.4 Nachweis von PEDV-RNA in Organproben .....	100
3.8.2 Untersuchung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV <i>in vivo</i> .....	100
3.8.2.1 Klinische Beurteilung des Einflusses von Gen 3 auf die Pathogenese der PED .....	101
3.8.2.2 Pathologische und histopathologische Untersuchung infizierter Ferkel zur Untersuchung von Gen 3 .....	102
3.8.2.3 Untersuchung des Virusgehaltes in Tupfer- und Blutproben.....	102
3.8.2.4 Nachweis von PEDV-RNA in Organproben .....	103
<b>4 Diskussion</b> .....	105
4.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für einen nordamerikanischen PEDV-Feldstamm.....	105
4.1.1 Einfluss der PEDV-5'UTR-Sequenz auf die Herstellung rekombinanter PEDVs .	106
4.1.2 Effekt des Austausches von Aminosäuren in S <sub>MN</sub> auf die Herstellung rekombinanter PEDVs.....	108
4.2 Charakterisierung von recPEDV-MN <i>in vivo</i> .....	110
4.2.1 Einfluss des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV <i>in vivo</i> .....	112
4.2.2 Einfluss von ORF3 auf die Virulenz von PEDV <i>in vivo</i> .....	113
4.3 Verwendungsmöglichkeiten für das revers-genetische System zur Herstellung von recPEDV-MN .....	114
4.3.1 Identifizierung von biologischen Markern und Genen mit Auswirkung auf die Virulenz von PEDV.....	114
4.3.2 Einsatz reverser Genetik zur Vakzineherstellung.....	115
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	117
<b>6 Summary</b> .....	119
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	120

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme eines Coronavirus. ....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels. ....	6
Abb. 3: Schematische Darstellung konservierter <i>cis</i> -aktiver Elemente in der 5'UTR von HCoV-229E.....	7
Abb. 4: Aufbau des Coronavirusgenoms. ....	8
Abb. 5: Proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab.....	10
Abb. 6: Coronavirale Proteinexpression. ....	11
Abb. 7: Modell zur Synthese subgenomischer mRNAs.....	12
Abb. 8: Klinik und Pathologie der PED. ....	14
Abb. 9: Epidemiologie der PED weltweit.....	18
Abb. 10: Phylogenetische Analyse globaler PEDV-Stämme basierend auf der Nukleotidsequenz des S-Gens.....	20
Abb. 11: Domänen innerhalb des S-Proteins.....	21
Abb. 12: Vollständigkeitskontrolle von vrecPEDV-MN.. ....	59
Abb. 13: Selektionsplasmide für die Einführung der PEDV-MN-cDNA in das Vacciniavirusgenom. ....	66
Abb. 14: Generierung von vrecPEDV-MN.....	67
Abb. 15: PCR-Fragmente zur Kontrolle der Selektionsrunden bei der Herstellung von vrecPEDV-MN.....	68
Abb. 16: Vollständigkeitskontrolle der gesamten PEDV-cDNA in vrecPEDV-MN.....	69
Abb. 17: Detektion der N-Expression von BHK-PEDV <sub>MN</sub> -N-Zellen im Western Blot. ....	70
Abb. 18: Überprüfung der Qualität von vrecPEDV-MN-DNA und recPEDV-RNA.....	70
Abb. 19: Schematische Darstellung des <i>Rescues</i> von rekombinanten PEDVs. ....	71
Abb. 20: Herstellung von vrecPEDV-MN-S <sub>MN</sub> -Δ3-GFP.....	72
Abb. 21: Herstellung von vrecPEDV-MN-S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP. ....	73
Abb. 22: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP. ....	75
Abb. 23: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP.....	76
Abb. 24: Nukleotidunterschiede zwischen 5'UTR <sub>CV777</sub> und 5'UTR <sub>MN</sub> . ....	77

Abb. 25: Generierung von vrecPEDVs mit Mutationen in der 5'UTR.....	78
Abb. 26: Schematische Darstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP, recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-C99T</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP und recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48, C99T</sub> - S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP.....	79
Abb. 27: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP. ....	81
Abb. 28: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP. ....	82
Abb. 29: Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -GFP.. ....	83
Abb. 30: Vergleich der Aminosäuresequenz des S-Proteins der Stämme MN, NPL2013 und PC22A an Positionen 221-230, 371-380 und 481-490. ....	85
Abb. 31: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP.....	86
Abb. 32: Rescue von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP. ....	87
Abb. 33: Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP.....	88
Abb. 34: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP. ....	89
Abb. 35: RecPEDVs für <i>In-vivo</i> -Experimente.....	90
Abb. 36: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> . ....	91
Abb. 37: Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> . ....	92
Abb. 38: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -3 <sub>CV777</sub> . ....	94
Abb. 39: Klinischer Score nach Infektion mit recPEDVs.. ....	96
Abb. 40: Histopathologische Untersuchungen. ....	98
Abb. 41: Rektale PEDV Ausscheidung.. ....	99
Abb. 42: Gehalt von PEDV-RNA in Organproben. ....	100
Abb. 43: Klinischer Score nach Infektion mit recPEDVs mit intaktem (recPEDV-S <sub>MN-L375F, H486P</sub> ) und trunkierten ORF3 (recPEDV-S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -3 <sub>CV777</sub> ).....	101
Abb. 44: Histopathologische Untersuchung zur Evaluierung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV.....	102
Abb. 45: PEDV Ausscheidung in den Fäzes. ....	103
Abb. 46: PEDV-RNA-Gehalt in Organproben. ....	103

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie der Subfamilie Coronavirinae, Familie Coronaviridae (International committee on Taxonomy of Viruses, 2017). .....	4
Tab. 2: Für Selektionen verwendete Ausgangsvacciniaviren, Selektionsplasmide, daraus entstandene rekombinante Vacciniaviren (vrecPEDVs) und rekombinante PEDVs (recPEDVs) .....	61
Tab. 3: Selektionsplasmide zur Generierung rekombinanter vPEDVs .....	63
Tab. 4: Herstellung von vrecPEDVs mit Mutationen in S <sub>MN</sub> .....	87

## Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	" <i>weight per volume</i> " (Massenkonzentration)
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
2'O-MT	2'-O-Methyltransferase
3CLpro	3C-ähnliche Protease
6-TG	6-Thioguanin
A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACE2	" <i>angiotensin converting enzyme 2</i> "
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dd.	<i>Aqua bidestillata</i>
ATCC	" <i>American Tissue Culture Collection</i> "
BAC	" <i>bacterial artificial chromosome</i> "
BHK	" <i>baby hamster kidney</i> "
bp	" <i>basepairs</i> " (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	" <i>copy-DNA</i> " (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CV-1	Nierenfibroblasten-Zelllinie aus <i>Chlorocebus aethiops</i> (grüne Meerkatze)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDP4	Dipeptidylpeptidase 4
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotriphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
E	" <i>envelope</i> " (kleines Membranprotein von Coronaviren)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamin-N, N, N, N-tetraacetat
EndoU	Endonuklease
ERGIC	" <i>endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment</i> "
ExoN	ExonukleaseN
F	Phenylalanin (in Proteinen)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin (in DNA/RNA); <i>Genogroup</i>
GE	Genomäquivalente
GFP	" <i>green fluorescent protein</i> "
<i>gpt</i>	Guanin-Phosphoribosyltransferase
h	Stunden
H	Histidin (in Proteinen); Helikase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Histologie); Hämagglutininesterase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

IU	<i>"international units"</i> (internationale Einheiten)
IVT	<i>In-vitro</i> -Transkription
kb	<i>"kilobases"</i> (Kilobasen)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria Bertani
M	Molar (bei Lösungen); <i>"membrane"</i> (Membranprotein von Coronaviren)
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mCEACAM	<i>"murine carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1"</i>
MEM	<i>"minimal essential medium"</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MN	PEDV Stamm Minnesota
MOI	<i>"multiplicity of infection"</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	<i>"messenger RNA"</i>
N	Nukleoprotein
N7-MT	N7-Methyltransferase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nsp	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
ORF	<i>"open reading frame"</i> (offener Leserahmen)
P	Prolin (in Proteinen); Primase
p.c.	<i>post contact</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
pAPN	porzine Aminopeptidase N
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PED	porzine epidemische Diarrhö
PEDV	Virus der porzinen epidemischen Diarrhö
PFU	<i>"plaque forming units"</i> (Plaque-bildende Einheiten)
PL	Papain-ähnliche Protease
pmol	Pikomol
pp	Polyprotein
PRCV	porzines respiratorisches Coronavirus
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
RACE	<i>"rapid amplification of cDNA ends"</i>
rATP	<i>"adenosine 5'-triphosphate"</i>
rCTP	<i>"cytidine 5'-triphosphate"</i>
RdRp	<i>"RNA dependent RNA polymerase"</i>
recPEDV	rekombinantes PEDV
rGTP	<i>"guanosine 5'-triphosphate"</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>"revolutions per minute"</i> (Umdrehungen pro Minute)



RT	reverse Transkription
rUTP	<i>"uridine 5'-triphosphate"</i>
s	Sekunde
S	Serin (in Proteinen); <i>"spike"</i> (coronavirales Fusionsprotein)
SDS	<i>"sodiumdodecylsulfate"</i> (Natriumlaurylsulfat)
sg	subgenomisch
S-INDEL	PEDV-Stämme mit bestimmten Insertionen und Deletionen im S-Gen
SL	<i>"stemloop"</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGEV	Virus der transmissiblen Gastroenteritis
TRS	Transkriptions-regulierende Sequenz
U	Uracil (in RNA); <i>"unit"</i> (Einheit)
UTR	<i>"untranslated region"</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
vrec	rekombinantes Vacciniavirus
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Coronaviren

Coronaviren spielen weltweit eine wichtige Rolle als Krankheitserreger bei Mensch und Tier und haben im Rahmen der SARS- (*severe acute respiratory syndrome*) und MERS-Epidemien (*middle east respiratory syndrome*) unerfreuliche Popularität erlangt. Abgesehen von diesen schweren systemischen Erkrankungen sind Coronaviren beim Menschen hauptsächlich für die Entstehung von Erkältungskrankheiten verantwortlich.

Auch bei Haus- und Nutztieren sind Coronaviren seit langem als Auslöser vor allem respiratorischer und intestinaler Erkrankungen bekannt (Fehr & Perlman 2015). Als Erkrankung der Haussäugetiere spielt die letal endende feline infektiöse Peritonitis (FIP) der Katzen eine wichtige Rolle. Coronavirusinfektionen von Nutztieren resultieren häufig in beträchtlichen wirtschaftlichen Einbußen. Hier ist das Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) zu nennen, welches bei Hühnervögeln zu Infektionen des Respirationstraktes und verminderter Eiqualität führt. Bei Rindern verursacht das bovine Coronavirus (BCoV) neben Diarrhö bei Kälbern und laktierenden Kühen auch respiratorische Erkrankungen. Das Schwein fungiert als Wirt mehrerer unterschiedlicher Coronavirus-Spezies (Zuniga et al. 2016). Zu diesen zählen zum einen Erreger von Durchfallerkrankungen, z. B. das Virus der porcinen epidemischen Diarrhö (PEDV), das Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) und porcine Deltacoronaviren (PDCoV) (Homwong et al. 2016, Woo et al. 2012). Des Weiteren sind das porcine respiratorische Coronavirus (PRCV) als Erreger subklinischer respiratorischer Infektionen (Saif & Wesley 1999) und das porcine hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus (PHEV) zu nennen. Letzteres verursacht in Schweinebeständen schwere neurologische Symptome sowie Kümmern und Erbrechen der Ferkel.

Abgesehen von großen wirtschaftlichen Verlusten sind Coronavirusinfektionen bei Schweinen noch von einem weiteren Gesichtspunkt aus von Bedeutung: ähnlich wie bei Influenzaviren spielen Schweine möglicherweise eine Rolle als „*mixing vessel*“ für Coronaviren. In jüngster Zeit hat das vermehrte Auftreten neuartiger, mit dem Fledermaus-Coronavirus HKU2 nahe verwandter porciner Alphacoronaviren zu Besorgnis geführt (Gong et al. 2017, Pan et al. 2017). Durch genetische Adaptation gelang es Fledermausviren, das Schwein als geeigneten Wirt zu infizieren. Außerdem konnten durch Rekombination entstandene Chimären verschiedener Coronaviren in Schweinen nachgewiesen werden (Akimkin et al. 2016, Boniotti et al. 2016). Das Überwinden der Speziesbarriere und das große Rekombinationspotential von Coronaviren verdeutlichen deren Adaptationsfähigkeit und sind im Hinblick auf die Entstehung von Zoonosen kritisch zu beurteilen.

### 1.1.1 Taxonomie

Coronaviren sind die häufigsten Vertreter der Ordnung *Nidovirales*, welche die Familien *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* und *Mesoniviridae* umfasst. Die Angehörigen dieser Familien, mit Ausnahme der Arteriviren, zeichnen sich dabei durch ihre große Genomlänge von 26-32 kb aus (Gorbalenya et al. 2006). Die Familie *Coronaviridae* beinhaltet die Unterfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae* (*International Committee on Taxonomy of Viruses* „ICTV“).

Alle Vertreter der Ordnung *Nidovirales* besitzen positiv-orientierte, einzelsträngige RNA-Genome und eine Lipidhülle sowie weitere, für diese Ordnung charakteristische Merkmale. Dazu zählen (a) die Bildung eines Satzes („*nested set*“; lat. „*nidus*“ = Nest) von 3'-koterminalen, subgenomischen *mRNAs* während der Transkription und (b) eine konservierte Genomorganisation mit Expression eines Replikasepolyproteins (Fehr & Perlman 2015). Dieses wird durch viruskodierte Proteasen in Nichtstrukturproteine (nsps) gespalten, welche eine wichtige Rolle für Transkription und Replikation spielen. Einige dieser nsps zeigen enzymatische Aktivitäten (c), z. B. eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), eine Helikase mit N-terminaler Zinkfingerdomäne, sowie eine Exonuklease (Snijder et al. 2003) und eine uridylspezifische Endonuklease (EndoU) (Deng, X. & Baker 2018), welche einzigartig für positivsträngige RNA-Viren sind.

Die heutige, phylogenetische Einteilung der Subfamilie *Coronavirinae* in die Genera *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- und *Deltacoronavirus* ersetzte die frühere Differenzierung der Viren aufgrund serologischer Untersuchungen. Für die letzten beiden Genera wird dabei ein gemeinsamer Entstehungsweg in Vögeln postuliert, während für Alpha- und Betacoronaviren ein Fledermaus-Coronavirus als einheitlicher Vorfahr vermutet wird (Woo et al. 2012). Das Genus *Alphacoronavirus* beinhaltet dabei zum einen die Spezies Alphacoronavirus 1, welcher die Subspezies felines Coronavirus (FCoV), canines Coronavirus (CCoV), transmissibles Gastroenteritis Virus (TGEV) und porcines respiratorisches Coronavirus (PRCV) zugeordnet sind. Zum anderen enthält diese Gattung die humanpathogenen Coronaviren HCoV-229E und HCoV-NL63, verschiedene Fledermauscoronaviren, das Mink coronavirus 1 sowie das in dieser Arbeit beschriebene Virus der porcinen epidemischen Diarrhö (PEDV). Die hochpathogenen humanen SARS- und MERS-Coronaviren (SARS-CoV, MERS-CoV) gehören ebenso wie die typischen Erkältungserreger HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 dem Genus *Betacoronavirus* an. Diese Gattung beinhaltet auch veterinärmedizinisch bedeutsame Spezies wie das porcine hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus (PHEV), das bovine (BCoV) und equine (ECoV) Coronavirus sowie das vielfach studierte Maushepatitis Virus (MHV). Auch diesem Genus gehören zahlreiche,

aus Fledermäusen isolierte Spezies an. Das wirtschaftlich bedeutsame Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) zählt neben weiteren, aviären Viren zur Gattung *Gammacoronavirus*. Diese umfasst außerdem bei Meeressäugern vorkommende Viren. Dem Genus *Deltacoronavirus* gehören neben zahlreichen, bei Vögeln auftretenden Viren auch die porcinen Deltacoronaviren (PDCoV) an, welche eine PEDV- und TGEV-ähnliche Symptomatik verursachen und daher klinisch nicht differenziert werden können. Tab. 1 zeigt eine aktuelle Übersicht der Taxonomie der Familie *Coronaviridae*.

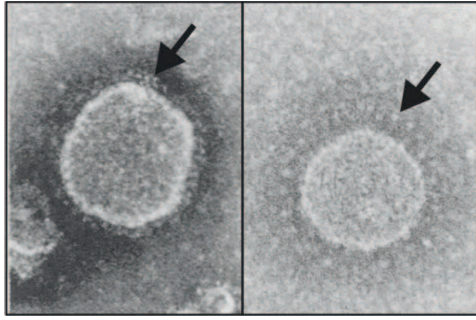
Genus	Spezies	Abkürzung
<i>Alphacoronavirus</i>	Alphacoronavirus 1	
	Canine coronavirus	CCoV
	Feline coronavirus	FCoV
	Transmissible gastroenteritis virus	TGEV
	Porcine respiratory coronavirus	PRCV
	Bat coronavirus CDPHE15	BatCoV CDPHE15
	Bat coronavirus HKU10	BatCoV HKU10
	Human coronavirus 229E	HCoV-229E
	Human coronavirus NL63	HCoV-NL63
	Miniopterus bat coronavirus 1	Mi-BatCoV 1
	Miniopterus bat coronavirus HKU8	Mi-BatCoV HKU8
	Mink coronavirus 1	MCV
	Porcine epidemic diarrhea virus	PEDV
	Rhinolophus bat coronavirus HKU2	Rh-BatCoV HKU2
	Scotophilus bat coronavirus 512	Sc-BatCoV 512
<i>Betacoronavirus</i>	Betacoronavirus 1	
	Bovine coronavirus	BCoV
	Equine coronavirus	ECoV
	Human coronavirus OC43	HCoV-OC43
	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	PHEV
	Hedgehog coronavirus 1	EriCoV
	Human coronavirus HKU1	HCoV-HKU 1
	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	MERS-CoV

	Murine coronavirus	
	Mouse hepatitis virus	MHV
	Rat coronavirus	RCoV
	Pipistrellus bat coronavirus HKU5	Pi-BatCoV HKU5
	Rousettus bat coronavirus HKU9	Ro-BatCoV HKU9
	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	SARS-CoV
	Tylonycteris bat coronavirus HKU4	Ty-BatCoV HKU4
<i>Gammacoronavirus</i>	Avian coronavirus	
	Infectious bronchitis virus	IBV
	Turkey coronavirus	TCoV
	Pheasant coronavirus	PhCoV
	Beluga whale coronavirus SW1	BWCoV SW1
<i>Deltacoronavirus</i>	Bulbul coronavirus HKU11	BuCoV HKU11
	Common moorhen coronavirus HKU21	CMCoV HKU21
	Coronavirus HKU15	PorCoV HKU15
	Munia coronavirus HKU13	MunCoV HKU13
	Night heron coronavirus HKU19	NHCoV HKU19
	Thrush coronavirus HKU12	ThCoV HKU12
	White-eye coronavirus HKU16	WECov HKU16
	Wigeon coronavirus HKU20	WiCoV HKU20

**Tab. 1: Taxonomie der Subfamilie Coronavirinae, Familie Coronaviridae (*International committee on Taxonomy of Viruses*, 2017).**

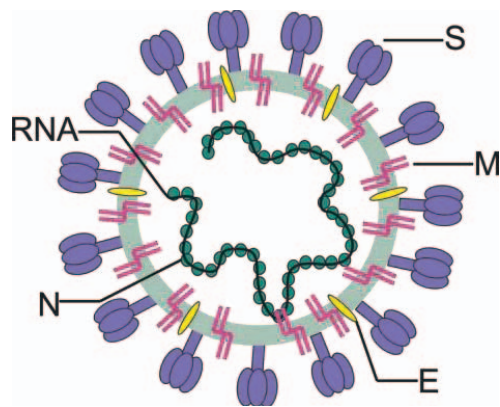
### 1.1.2 Morphologie

Coronaviren stellen sich als behüllte, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 80-140 nm dar, welche im Wesentlichen die 4 Strukturproteine S, E, M und N beinhalten (Barcena et al. 2009, Neuman et al. 2006) (Abb. 2). Das Spike-Protein (S) formt als Homotrimer kegelförmige Projektionen auf der Virusoberfläche, welche im Elektronenmikroskop an den Strahlenkranz der Sonne erinnern und namensgebend für die Familie *Coronaviridae* waren (lat. „*corona*“ = Kranz, Krone) (Abb. 1).



**Abb. 1: Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme eines Coronavirus.** Die negativkontrastierte EM-Aufnahme zeigt einen PEDV-Partikel (Turgeon et al. 1981). Die Spike-Protein-Homotrimere (Pfeile) sind deutlich auf der Virusoberfläche sichtbar und erinnern an den Strahlenkranz der Sonne.

Das S-Protein (150-200 kDa) ist ein glykosyliertes Klasse-I-Fusionsprotein (Bosch et al. 2003), welches durch proteolytische Prozessierung, zu je nach Coronavirus unterschiedlichen Zeitpunkten im Replikationszyklus, in 2 Untereinheiten gespalten wird (Millet & Whittaker 2015). Die S1-Domäne ist als Rezeptor-Bindungsdomäne für die Anheftung an die Zielzelle verantwortlich, während die Fusionsdomäne der S2-Untereinheit die Verschmelzung der viralen und zellulären Membranen vermittelt. Neben der Domäne zur Bindung an virusspezifische Rezeptoren enthält die S1-Untereinheit einiger Coronaviren Bereiche, die durch Anheftung an Sialinsäuren eine erste Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszelle ermöglichen und den Gewebstropismus entscheidend mitbestimmen (Li, W. et al. 2016, Liu, C. et al. 2015, Schwegmann-Wessels & Herrler 2006). Außerdem ist das S-Protein wesentlich an der Bildung neutralisierender Antikörper beteiligt. Das ebenfalls an Sialinsäuren bindende HE-Protein (Hämagglutininesterase) kommt nur bei einigen Vertretern der Betacoronaviren vor und besitzt Acetyleraseaktivität, welche vermutlich die Virusausbreitung durch die Mukosa erleichtert (Cornelissen et al. 1997, Klausegger et al. 1999). In großer Menge im Virion vorhanden ist das M-Protein (*membrane*, 25-30 kDa), welches mit 3 Transmembrandomänen in der Virushülle inseriert und formgebend für die Partikel ist. Interaktionen mit anderen Strukturproteinen (z. B. N-Protein) und genomischen RNA-„*packaging*“-Signalen verdeutlichen seine Funktion für den Zusammenbau (*Assembly*) neu gebildeter Virionen (Narayanan et al. 2003, Neuman & Buchmeier 2016). Ein weiteres, für den Zusammenbau der Viruspartikel wichtiges Protein ist das kleine Membranprotein E (*envelope*, 8-12 kDa), welches nur in geringer Menge im Virion enthalten ist (Ortego et al. 2007). Neuere Studien legen einen Zusammenhang zwischen E-Protein und der Genese entzündlicher Erkrankungen nahe (Xu et al. 2013).



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels.** Das helikale Nukleokapsid besteht aus Nukleoprotein (N) und RNA. In die Lipidhülle eingelagert sind das Spike-Protein (S), das Membran-Protein (M) sowie das Envelope-Protein (E).

Innerhalb der Lipidhülle liegt das helikal symmetrische Nukleokapsid, welches sich aus der genomischen RNA und dem phosphorylierten N-Protein (*nucleocapsid*, 43-55 kDa) zusammensetzt. Letzteres ist an mehreren Stellen an der Vermehrung von Coronaviren beteiligt; zum einen unterstützt es durch Interaktion mit dem M-Protein bzw. mit dem genomischen RNA-„*packaging*“-Signal die Entstehung neuer Virionen (Kuo et al. 2014, Kuo et al. 2016, Molenkamp & Spaan 1997), zum anderen formt es durch Bindung an genomische RNA die Helixstruktur des Nukleokapsids (Saikatendu et al. 2007). Außerdem hat es entscheidenden Anteil an der viralen Replikation und Transkription (Almazan et al. 2004, Zuniga et al. 2010, Zuniga et al. 2007) und hat als Interferon  $\beta$ -Antagonist immunsuppressive Wirkungen (Ding et al. 2014).

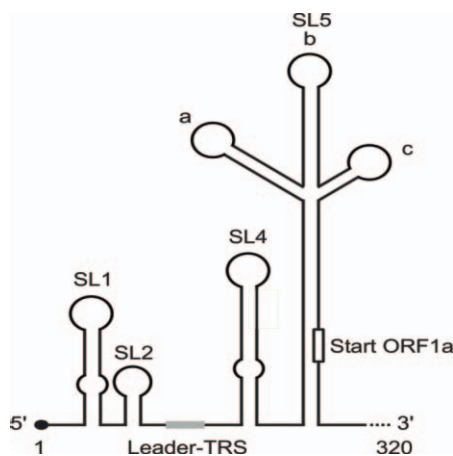
### 1.1.3 Genomorganisation

Coronaviren besitzen ein 26-32 kb langes, lineares, nicht-segmentiertes RNA-Genom mit positiver Polarität (Eckerle et al. 2010, Gorbalenya et al. 2006). Da die positiv-orientierte RNA eine Cap-Struktur am 5'-Ende (Lai & Stohlman 1981) und einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende besitzt (Lai & Stohlman 1978, Lomniczi 1977, Masters 2006, Schochetman et al. 1977, Wege et al. 1978), ähnelt sie strukturell der eukaryotischen mRNA und induziert nach Freisetzung die sofortige Translation viraler Proteine an den Ribosomen. Diese Eigenschaft ermöglicht die Herstellung rekombinanter Coronaviren auf Basis revers-genetischer Systeme durch Transfektion der genomlangen RNA in Zellen (Almazan et al. 2000, Casais et al. 2001, Coley et al. 2005, Tekes et al. 2010, Tekes et al. 2008, Tekes et al. 2012, Thiel et al. 2001, Yount et al. 2000, Yount et al. 2003, Yount et al. 2002).

Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des coronaviralen Genoms befindet sich ein nichttranslatierter Bereich (*untranslated region*, UTR) von einigen Hundert Nukleotiden. Diese Regionen enthalten konservierte Sequenzmotive und *cis*-aktive Elemente, welche sich am 5'-Ende des Genoms bis in ORF1a fortsetzen und für die Replikation benötigt werden (Madhugiri et al. 2018, Yang & Leibowitz 2015). Des Weiteren konnte eine wichtige Rolle der UTRs in der diskontinuierlichen Synthese subgenomischer RNAs gezeigt werden.

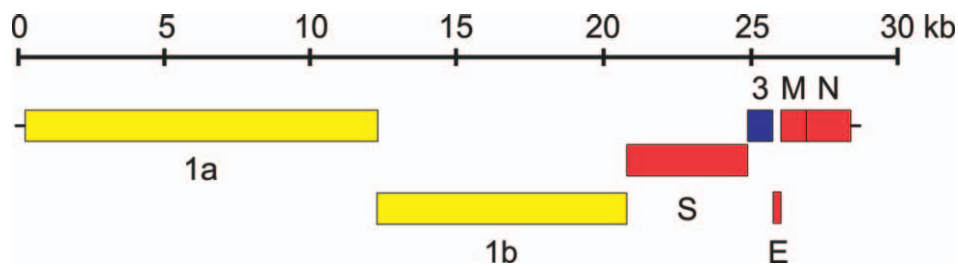


Sekundärstrukturelemente (*Stemloops*, *SL*) in der 5'UTR sind innerhalb der einzelnen Genera hochkonserviert (Abb. 3). SL1, SL2 und SL4 finden sich dabei sowohl bei Alpha-, Gamma- und Betacoronaviren. Während biochemische Analysen für letztere 3 weitere SLs 5, 6 und 7 voraussagen (Madhugiri et al. 2016), verfügen Alphacoronaviren außerdem noch über SL5ABC (Madhugiri et al. 2014). Die Zerstörung dieser Strukturen bzw. konservierter Sequenzmotive kann letal für die Viren sein (Liu, P. et al. 2007, Madhugiri et al. 2018). Die ersten 65-98 Nukleotide der 5'UTR beinhalten die „*Leader-Sequenz*“, welche sich am 5'-Ende aller coronaviralen RNAs wiederfindet (Lai et al. 1984, Lai et al. 1983, Leibowitz & Weiss 1981, Spaan et al. 1982). Eine konservierte Sequenz von 6-8 Nukleotiden am 3'-Ende der *Leader-Sequenz* wird als *Leader-TRS* (TRS-L) bezeichnet und wirkt als *cis*-aktives Element regulierend auf die Transkription (Budzilowicz et al. 1985, Sola et al. 2005).



**Abb. 3: Schematische Darstellung konservierter *cis*-aktiver Elemente in der 5'UTR von HCoV-229E.** Die *Stemloops* (SL) 1-5 im Genombereich von Nukleotid 1-320 sind abgebildet. Ein grauer Kasten symbolisiert die *Leader-TRS*, ein weißer Kasten das Startcodon für ORF1a (Abb. modifiziert nach Madhugiri et al. 2016).

Im Anschluss an die 5'UTR folgt der kodierende Bereich der Coronavirus-RNA (Abb. 4). Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) 1 umfasst zwei Drittel des Genoms und kann in ORF1a und b unterteilt werden. Er kodiert die beiden Polyproteine 1a (pp1a) und 1ab (pp1ab), welche posttranslational von viruskodierten Proteasen in 16 Nichtstrukturproteine prozessiert werden (Ziebuhr et al. 2000). Für die Translation von pp1ab ist ein ribosomaler *Frameshift* nötig. Bei diesem Vorgang wird das Ribosom an einer Pseudoknoten-Struktur angehalten und kommt auf einer direkt *upstream* gelegenen *Slippery-Sequence* (5'-UUUAAAC-3') zum Erliegen. Hier bewegt sich das Ribosom ein Nukleotid in 5'-Richtung um anschließend in einem neuen Leserahmen die Translation fortzusetzen (Baranov et al. 2005, Brierley et al. 1989). *In-vitro*-Studien zeigen eine Inzidenz von nur 25% für ribosomales *Frameshifting*, was die Vermutung nahe legt, dass ORF1b-kodierte Genprodukte erst später im Rahmen der Infektion produziert werden. Stromabwärts des Replikasegens liegen die Gene für die Strukturproteine S, E, M und N. Das bei einigen Betacoronaviren vorkommende HE-Gen ist zwischen Replikase- und S-Gen zu finden. Im 3'-terminalen Drittel des Genoms findet sich außerdem eine speziesspezifische Anzahl verschiedener akzessorischer Proteine, deren Funktion in vielen Fällen noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte.



**Abb. 4: Aufbau des Coronavirusgenoms.** Der Genomaufbau ist beispielhaft anhand von PEDV dargestellt. Die nichttranslatierten Bereiche (5'UTR und 3'UTR) sind als schwarze Linien abgebildet. ORFs für die Replikasepolyproteine sind gelb dargestellt, Bereiche die für Strukturproteine kodieren rot und ORFs für akzessorische Proteine blau.

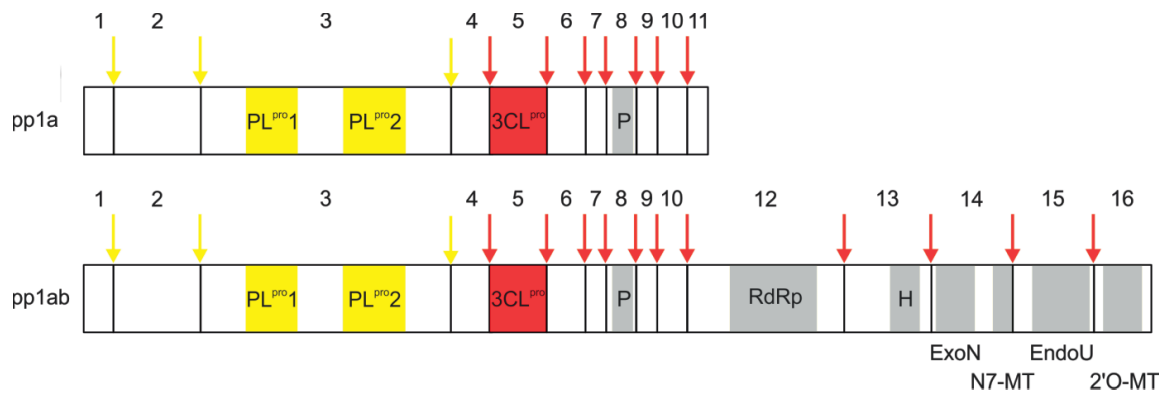
### 1.1.4 Der coronavirale Replikationszyklus

Für die Infektion einer Zielzelle und die anschließende Replikation von Coronaviren ist initial eine Adsorption der Virionen an die Wirtszelle erforderlich, welche durch Bindung des S-Proteins an einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird. Aminopeptidase N (APN) fungiert für einige Alphacoronaviren (TGEV, HCoV-229E, CCoV und FCoV-Typ II-Isolate) als Rezeptor (Benbacer et al. 1997, Delmas et al. 1992, Reguera et al. 2012, Tekes et al. 2010, Tresnan et al. 1996, Yeager et al. 1992). Lange Zeit wurde porcine APN ebenfalls als Rezeptor für PEDV vermutet (Deng, F. et al. 2016, Kamau et al. 2017, Li, B. X. et al. 2007, Park, J. E. et al. 2015), neuere Studie widerlegen diese Theorie jedoch (Ji et al. 2018, Li, W. et al. 2017, Shirato et al. 2016). SARS-CoV und HCoV-NL63 binden an *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) (Hofmann, H. et al. 2005, Li, W. et al. 2003), wogegen MERS-CoV Dipeptidylpeptidase 4 (DDP4) zur Adsorption verwendet (Raj et al. 2013). Das *murine carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1* (mCEACAM), welches die Bindung an MHV vermittelt, kommt als weiterer Rezeptor für Betacoronaviren hinzu (Nedellec et al. 1994, Williams et al. 1991). In vielen Fällen spielt auch die Bindung an zelluläre Sialinsäuren eine Rolle (1.1.2), entweder als primärer Rezeptor, z. B. bei BCoV (Schultze & Herrler 1992), oder als Korezeptor im Fall von TGEV (Krempf et al. 1997, Schultze et al. 1996, Schwegmann-Wessels & Herrler 2006). Dies trifft neuesten Studien zufolge auch für PEDV zu (Deng, F. et al. 2016, Huan et al. 2015, Liu, C. et al. 2015).

Nach der Bindung an den Rezeptor folgt die Penetration der Viren in das Zytoplasma sowie die Freisetzung der Nukleinsäure (*Uncoating*). Als Voraussetzung für die Bindung des S-Proteins an den Rezeptor wurde bei einigen Coronaviren eine proteolytische Spaltung der S1- und S2-Untereinheiten beschrieben. Bei MHV erfolgt diese durch die Protease Furin zwischen der S1- und S2-Domäne bereits während der Biogenese, sodass freigesetzte Virionen über ein gespaltenes S-Protein verfügen und eine direkte Zell-zu-Zell-Fusion auslösen können (Belouzard et al. 2012). Bei den meisten Coronaviren, welche nicht über

eine Furin-Schnittstelle verfügen (z. B. SARS-CoV, HCoV-229E), erfolgt die Penetration der Zelle durch rezeptor-vermittelte Endozytose (Burkard et al. 2014, Eifart et al. 2007, Inoue et al. 2007, Nomura et al. 2004). Eine durch endosomale pH-Wert-Änderung induzierte Proteaseaktivierung führt anschließend zur Spaltung des S-Proteins zwischen der S1- und S2-Untereinheit und/oder an einer zweiten, innerhalb der S2-Untereinheit gelegenen Schnittstelle (S2') mit nachfolgender Membranfusion (Belouzard et al. 2012, Burkard et al. 2014, Heald-Sargent & Gallagher 2012, Li, W. et al. 2016, Millet & Whittaker 2015). Alternativ dazu kann diese auch nach Rezeptorbindung, direkt an der Zelloberfläche, über eine Aktivierung der Fusionsdomäne durch exogene Proteasen, beispielsweise Trypsin, erfolgen. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für PEDV gezeigt werden (Li, W. et al. 2016, Millet & Whittaker 2015, Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011, Wicht et al. 2014).

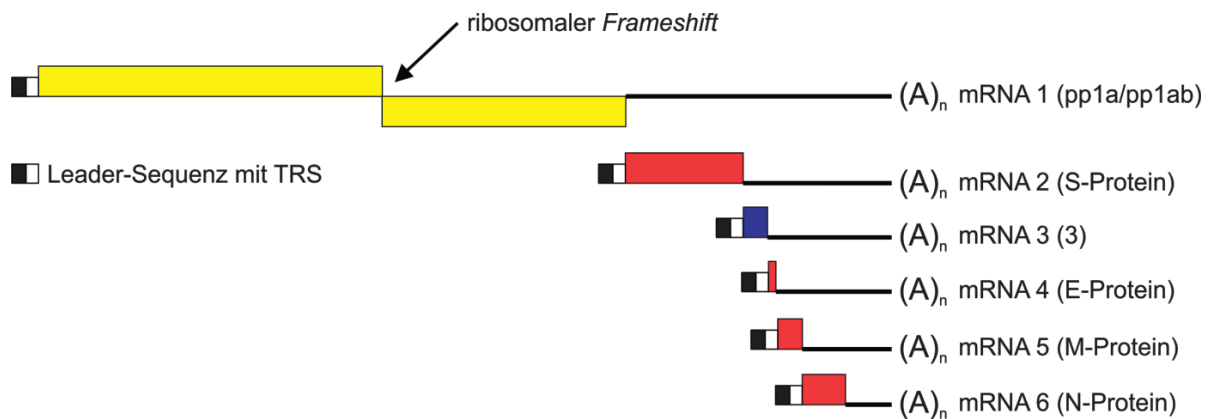
Nach Freisetzung der Nukleinsäure ins Zytoplasma erfolgt die Translation der coronaviralen RNA in die Polyproteine pp1a und pp1ab, welche ko- und posttranslational durch viruskodierte Proteasen in 16 Nichtstrukturproteine gespalten werden (Snijder et al. 2016, Ziebuhr et al. 2000) (Abb. 5). Ein oder zwei durch nsp3 kodierte Papain-ähnliche Proteasen (PL<sup>pro</sup>1, PL<sup>pro</sup>2) sind für die Spaltung der nsp1/2-, nsp2/3- und nsp3/4-Schnittstellen verantwortlich. Die Prozessierung der restlichen Nichtstrukturproteine (nsps) erfolgt durch die nsp5-kodierte Hauptprotease *3C-like proteinase* (3CL<sup>pro</sup>) (Mielech et al. 2014, Ziebuhr et al. 1995, Ziebuhr & Siddell 1999, Ziebuhr et al. 2001). Die Funktionen der 16 Nichtstrukturproteine im Replikationszyklus sind vielfältig: nsp12 kodiert die RdRp, welche zusammen mit der Helikase (nsp13), nsp7, nsp8 und nsp9 den Replikations-Transkriptions-Komplex (RTK) bildet (Sola et al. 2015). Nsp14 beinhaltet eine Exonukleaseaktivität (Eckerle et al. 2010, Eckerle et al. 2007, Graham et al. 2012, Snijder et al. 2016) und ist damit Teil eines für RNA-Viren einzigartigen Korrekturlese (*proofreading*)-Systems, zu welchem auch nsp10 und die Endonuklease (EndoU; nsp15) zählen (Deng, X. & Baker 2018, Snijder et al. 2016). Eine ebenfalls in nsp14 enthaltene N7-Methyltransferase-Aktivität ist zusammen mit nsp13 und nsp16 (2'-O-Methyltransferase) an der Erstellung der 5'-Cap-Struktur beteiligt. Außerdem konnte für einige nsps, beispielsweise nsp1, eine Unterdrückung der Immunantwort durch Modulation der Interferon-Signalkaskade gezeigt werden (Kamitani et al. 2006, Zhang, Q. et al. 2016, Züst et al. 2007).



**Abb. 5: Proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab.** Die Spaltstellen für die Papain-ähnliche Proteasen PL<sup>pro1</sup> und PL<sup>pro2</sup> sind gelb, die Spaltstellen für die Hauptprotease 3CL<sup>pro</sup> rot markiert. Zahlen (1-16) beziffern die entstehenden Nichtstrukturproteine. Graue Boxen symbolisieren spezifische Replikasedomänen (P: Primase; RdRp: RNA-abhängige-RNA-Polymerase; H: Helikase; ExoN: ExonukleaseN; EndoU: Endonuklease; N7-MT: N7-Methyltransferase; 2'O-MT: 2'-O-Methyltransferase; Abb. modifiziert nach Sola et al. 2015).

Die Replikation der Coronaviren findet assoziiert an intrazellulären Membranen statt, die durch Modifikation des endoplasmatischen Retikulums entstehen (Knoops et al. 2008, Oudshoorn et al. 2017). Der Prozess wird durch Bindung der RdRp an das 3'Ende initiiert (Hsue et al. 2000, Masters 2006, Sola et al. 2011). Durch kontinuierliche RNA-Synthese entsteht eine negativsträngige Genomkopie, welche als Matrize für die Synthese positiv-orientierter genomlanger RNAs für den Zusammenbau von Nachkommensvirionen dient (Lai et al. 1982, Sola et al. 2015).

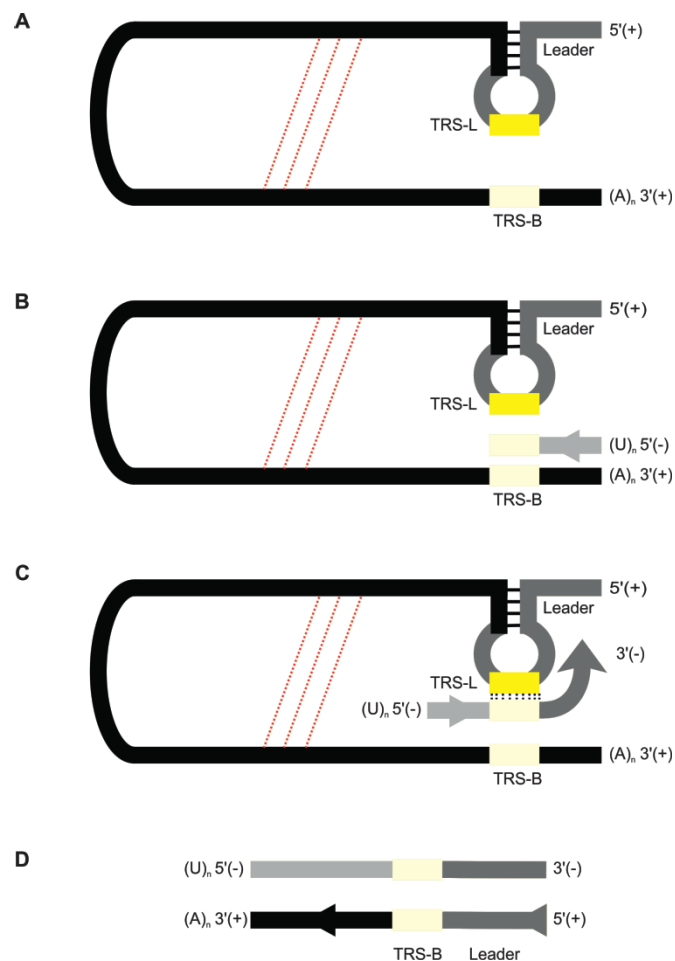
Die coronavirale Transkription dagegen erfolgt durch diskontinuierliche Synthese, welche zur Bildung eines sogenannten „*nested set*“ subgenomischer RNAs (sgmRNAs) führt (Enjuanes et al. 2008, Sawicki, S. G. & Sawicki 1998) (Abb. 6). Diese sgmRNAs sind sowohl 5'- als auch 3'-koterminale (Madhugiri et al. 2016). Alle sgmRNAs beinhalten am 5'-Ende die 65-98 nukleotidlange Leader-Sequenz (Spaan et al. 1983) (1.1.3) und ein identisches 3'-Ende, welches der genomischen Sequenz entspricht. Dazwischen liegt eine unterschiedliche Anzahl von ORFs, von welchen jedoch nur der am 5'-Ende gelegene translatiert wird. Somit sind die sgmRNAs strukturell polycistronisch, funktionell jedoch monocistronisch.



**Abb. 6: Coronavirale Proteinexpression.** Der Aufbau coronaviraler mRNAs wird am Beispiel von PEDV gezeigt. Farbige Rechtecke symbolisieren translatierte Bereiche ((A)<sub>n</sub>: Poly-A-Schwanz, TRS: Transkriptions-regulierende Sequenz; Abb. modifiziert nach Tekes et al. 2008).

Die Synthese dieser sgRNAs ist komplex reguliert, wobei konservierte, wiederkehrende Sequenzmotive, die Transkriptions-regulierenden Sequenzen (TRS, *transcription-regulating sequence*), eine entscheidende Rolle spielen. Diese sind im Genom sowohl *upstream* der ORFs (Body-TRS) als auch am 3'-Terminus der Leader-Sequenz (Leader-TRS) zu finden (Madhugiri et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass der diskontinuierliche Schritt bei der Erstellung sgRNAs während der Negativstrangsynthese stattfindet (Pasternak et al. 2001, Sawicki, S. G. et al. 2007, Van Marle et al. 1999, Zuniga et al. 2004). Bezüglich des Ablaufes der coronaviralen Transkription existieren einige Hypothesen, auch wenn der genaue Hergang noch unbekannt ist. Das Modell nach Sola et al. (Sola et al. 2015) ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. Die RNA-Synthese wird am 3'-Ende des positivsträngigen Genoms durch den Replikations-Transkriptionskomplex initiiert. An einer Body-TRS wird die Synthese des Negativstranges abgestoppt (Enjuanes et al. 2006) (Abb. 7B) und der neu synthetisierte RNA-Strang an das 5'-Genomende verlagert (Fehr & Perlman 2015, Madhugiri et al. 2016, Sola et al. 2015). Nach Basenpaarung mit der Leader-TRS wird die Synthese des Negativstranges vervollständigt (Abb. 7C). Dieser dient anschließend als Matrize für die Herstellung positivsträngiger sgRNAs für die Proteinsynthese (Lai et al. 1983, Sawicki, D. L. et al. 2001, Sawicki, S. G. & Sawicki 1995, Spaan et al. 1983) (Abb. 7D).

Dieser Vorgang wird vermutlich durch weitreichende RNA-RNA- bzw. RNA-Protein-Interaktionen reguliert, durch welche das 3'-Ende der genomischen RNA in die Nähe der Leader-Sequenz verlagert wird (Moreno et al. 2008) (Abb. 7A). Möglicherweise haben diese Interaktionen auch einen Einfluss auf die Bildung bestimmter sgRNAs zu bestimmten Zeitpunkten im Replikationszyklus.



**Abb. 7: Modell zur Synthese subgenomischer mRNAs.** (A) RNA-RNA- bzw. RNA-Protein-Interaktionen (rote gestrichelte Linien) führen zur Verlagerung der Body-TRS (TRS-B, hellgelb) in die Nähe der Leader-TRS (TRS-L, gelb). (B) Die Minusstrangsynthese (hellgrau) startet am 3'-Ende der genomischen RNA (schwarz) und wird an der Body-TRS abgestoppt. (C) Die räumliche Nähe ermöglicht eine Basenpaarung (schwarze gestrichelte Linien) zwischen Body-TRS und Leader-TRS, welche zur Translokation des neu synthetisierten Minusstranges an das 5'-Ende des Genoms führt. Anschließend wird die Synthese des Minusstranges durch Komplementierung der Leader-Sequenz (Leader) beendet. (D) Der neu synthetisierte Minusstrang dient als Matrize für die Synthese positivsträngiger sgmRNAs, die an ihrem 5'-Ende die Leader-Sequenz mit anschließender Body-TRS beinhalten (Abb. modifiziert nach Sola et al. 2015).

Das stöchiometrische Verhältnis, in welchem die einzelnen sgmRNAs gebildet werden, wird dabei, abgesehen vom Ausmaß der RNA-RNA- bzw. RNA-Protein-Interaktionen, noch von einer Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. Hierfür ist die Anzahl komplementärer Nukleotide zwischen der Body- und Leader-TRS (Sola et al. 2005, Zuniga et al. 2004) ebenso ausschlaggebend wie die Sekundärstruktur der TRS (Dufour et al. 2011, Enjuanes et al. 2006, Madhugiri et al. 2016, Sola et al. 2011).

Die Zusammensetzung von Nachkommensvirionen (*Assembly*) findet am *endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) statt. Hier werden coronavirale, mit dem N-Protein assoziierte Genome mit Membranen des ERGIC, welche bereits virale

Strukturproteine enthalten, umhüllt (*Budding*) (De Haan & Rottier 2005). Die neugebildeten Viruspartikel werden anschließend in Vesikeln zur Zellmembran transportiert und durch Exozytose freigesetzt (Fehr & Perlman 2015).

## **1.2 Das Virus der porzinen epidemischen Diarrhö (PEDV)**

Das Auftreten hochvirulenter porziner Coronaviren in den USA hat im April 2013 zu großer Besorgnis bei Schweinebesitzern geführt und sowohl Tierärzte als auch Virologen weltweit alarmiert (Huang et al. 2013, Stevenson et al. 2013). Innerhalb eines Jahres wurden die amerikanischen Schweinebestände um 10 % dezimiert, was einem Verlust von 7 Millionen Ferkeln entsprach (Jung & Saif 2015, Lin et al. 2016). Das klinische, durch Diarrhö geprägte Bild deutete auf einen Ausbruch von transmissibler Gastroenteritis hin. Labordiagnostische Methoden zeigten jedoch, dass es sich bei dem auslösenden Agens um ein dem TGEV nahe verwandtes Alphacoronavirus handelte: Das Virus der porzinen epidemischen Diarrhö (PEDV) (Stevenson et al. 2013). Um für ein Auftreten der durch PEDV verursachten porzinen epidemischen Diarrhö (PED) auch in Europa gerüstet zu sein, rückte die Erforschung des Virus in den darauffolgenden Jahren in den Fokus.

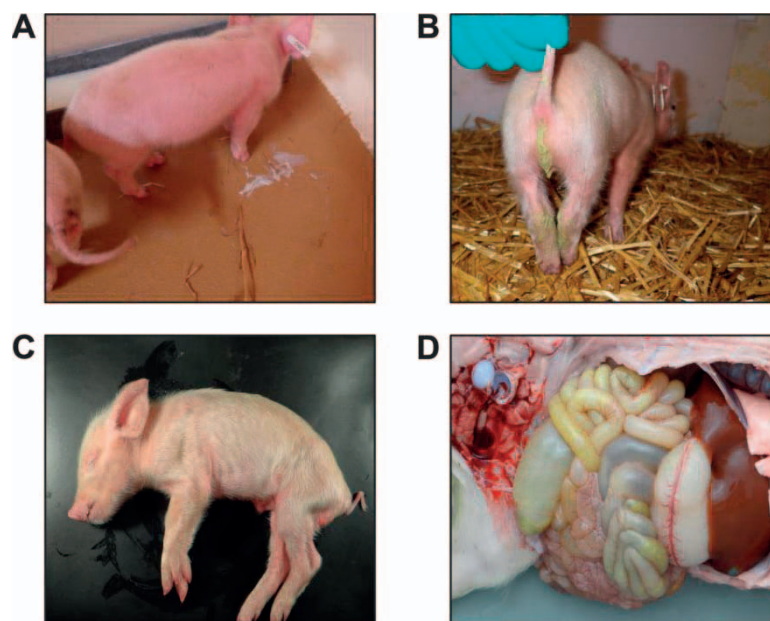
### **1.2.1 Klinik und Pathogenese der PED**

Zu den häufigsten und dramatischsten Symptomen der PED zählen Vomitus (Niederwerder et al. 2016) und wässriger Durchfall (Abb. 8A und B), welche typischerweise innerhalb von 22-36 Stunden nach der Infektion auftreten. Diese führen häufig zu einer drastischen Dehydratation (Abb. 8C) und innerhalb von 3-4 Tagen zum Tod. Hiervon sind insbesondere Saugferkel betroffen. Diese erkranken oft bis zu 100 % (Li, W. et al. 2012, Pensaert, M. 1999) innerhalb der ersten Lebensstage (Song, D. & Park 2012). Mortalitätsraten zwischen 50 und 100 % können dabei zum Verlust ganzer Nachzuchten führen. Basierend auf klinischen und epidemiologischen Erhebungen lassen sich PEDV-Stämme in sogenannte „klassische“ (Klinik wie oben beschrieben), „hochvirulente“ und „schwachvirulente“ Stämme unterteilen (Lin et al. 2016) (1.2.2). Hochvirulente Stämme zeichnen sich durch kurze Inkubationszeiten (12-24 Stunden), niedrige Infektionsdosen und eine Mortalität von annähernd 100 % aus. Dagegen resultieren Infektionen mit schwachvirulenten Stämmen (S-INDEL) (1.2.2) meist in milden klinischen Symptomen mit deutlich verlängerter Inkubationszeit und nur geringen Mortalitätsraten. Allerdings wurden in manchen Betrieben auch schwerere klinische Ausprägungen beobachtet (Lin et al. 2016, Mesquita et al. 2015, Stadler et al. 2015).

Abgesehen von Saugferkeln können von der PED auch ältere Tiere betroffen sein. Insbesondere Absetzer und Mastferkel erkranken dabei schwer und zeigen wässrige



Diarrhö, Anorexie und Apathie sowie abdominalen Schmerz und akute Rückenmuskelnekrose. Im Gegensatz zu Jungtieren sind die älteren Tiere jedoch in der Lage, sich innerhalb von 7-10 Tagen zu erholen, sodass die Mortalität nur bei etwa 1-3 % liegt. Problematisch ist eine endemische Persistenz des Virus in Absatz- und Mastferkelherden ohne offensichtliche klinische Ausprägung (Jung & Saif 2015, Niederwerder et al. 2016, Pijpers et al. 1993). Durch Tierbewegungen kann dies immer wieder zu neuen Ausbrüchen bei frisch eingestellten Schweinen oder Saugferkeln führen, da auch Zuchtsauen und –eber subklinisch erkrankt sein können und das Virus an die Nachkommen weitergeben. Die Virusübertragung erfolgt über die fäkal-orale Route durch Kontakt mit Fäzes/Vomitur infizierter Tiere. Auch kontaminierte Gegenstände, Transportmittel (Lowe et al. 2014) sowie Futter können als Vektoren dienen (Dee et al. 2014). Eine Übertragung über Aerosole ist zwar theoretisch möglich, spielt aber höchstwahrscheinlich nur eine geringe Rolle für die Verbreitung des Virus (Alonso et al. 2014).



**Abb. 8: Klinik und Pathologie der PED.** (A) Vomitur nach Milchaufnahme. (B) Gelblich-wässrige Diarrhö 24 Stunden *post infectionem* (p.i.). (C) Starke Dehydratation und Auszehrung eines Ferkels 4 Tage p.i. (D) Die pathologische Untersuchung 4 Tage p.i. zeigt einen dilatierten Magen sowie stark dilatierte, mit gelb-grünlichem, flüssigem Inhalt gefüllte Dünndarmschlingen.

Die oben beschriebenen klinischen Symptome resultieren aus einer PEDV-Infektion der Dünndarmepithelzellen, die eine Zelldegeneration mit darauffolgender Zerstörung und Atrophie des Darmepithels verursacht. Dies äußert sich durch eine charakteristische Verkürzung der intestinalen Villi, welche mittels histologischer Messverfahren ermittelt werden kann und eine Aussage über die Schwere der Erkrankung liefert (Jung et al. 2015,



Jung et al. 2014, Pensaert, M. 1999). Besonders nach Infektionen mit hochvirulenten PEDV-Stämmen wurde eine hochgradige Villusatrophie mit drastischer Verkürzung der Villushöhe beobachtet (Lin et al. 2016). Neben Dünndarmabschnitten können auch Colonepithelzellen von der Infektion betroffen sein (De Bouck et al. 1981, Jung et al. 2014). Die Zerstörung der Darmzotten führt zu intestinaler Malabsorption, welche in einer osmotischen Diarrhö mit anschließender Dehydratation und Auszehrung resultiert (Li, W. et al. 2012) (Abb. 8B und C). Hohe Mortalitätsraten bei Saugferkeln lassen sich durch eine geringere Proliferationsrate der Epithelzellen erklären (Jung et al. 2015). Dadurch ist die Dünndarmschleimhaut im Gegensatz zu älteren Tieren nicht in der Lage, sich schnell genug zu regenerieren um Absorptionsdefizite auszugleichen. Eine bei Jungtieren niedrigere Becherzelldichte und somit verminderte Produktion einer schützenden Muzinschicht kommt als weiterer Faktor hinzu (Jung & Saif 2017).

Bei der makroskopisch-pathologischen Untersuchung fällt insbesondere ein dilatierter, dünnwandiger Dünndarm auf, welcher hochgradig mit gelblichem, wässrigem Inhalt und Gas gefüllt ist (Chen, Q. et al. 2016, Jung et al. 2014, Song, D. & Park 2012). Auch der Magen ist häufig stark erweitert und enthält große Mengen unverdauter Milch (Abb. 8D).

Das Vorkommen von PEDV in Geweben außerhalb des Gastrointestinaltraktes wird kontrovers diskutiert und konnte in klinischen Studien bis auf wenige Ausnahmen (Park, J. E. & Shin 2014) bisher nicht nachgewiesen werden (Chen, Q. et al. 2016, Jung et al. 2015, Jung et al. 2014, Lin et al. 2017, Niederwerder et al. 2016).

Anhand der klinischen Symptomatik lässt sich PEDV kaum von anderen Viren wie TGEV, PDCoV, dem neu aufgetretenen porzinen HKU2 oder Rotaviren differenzieren (De Bouck et al. 1981, Gong et al. 2017, Homwong et al. 2016, Pan et al. 2017, Pensaert, M. 1999, Turgeon et al. 1981, Woo et al. 2012). Auch Bakterien wie *E. coli* oder einzellige Parasiten gehören zu den Differenzialdiagnosen.

## **1.2.2 Epidemiologie der PED**

### **1.2.2.1 Zeitliche und räumliche Verbreitung der PED**

Der erste offizielle PED-Ausbruch wurde 1971 in England dokumentiert (Oldham 1972). Da das auslösende Agens zu dieser Zeit noch unbekannt war, jedoch eine Virusinfektion vermutet wurde, nannte man die Krankheit epidemische virale Diarrhö (EVD). Weitere Krankheitsausbrüche in England und Belgien folgten. 1978 konnte erstmals einer der Erreger aus erkrankten Schweinen isoliert und seine Infektiosität für Ferkel und Masttschweine gezeigt werden (Chasey & Cartwright 1978, De Bouck & Pensaert 1980, Pensaert, M. & De Bouck 1978). Das CV777 (*coronavirus-like agent*) genannte Isolat konnte auf Vero-Zellen

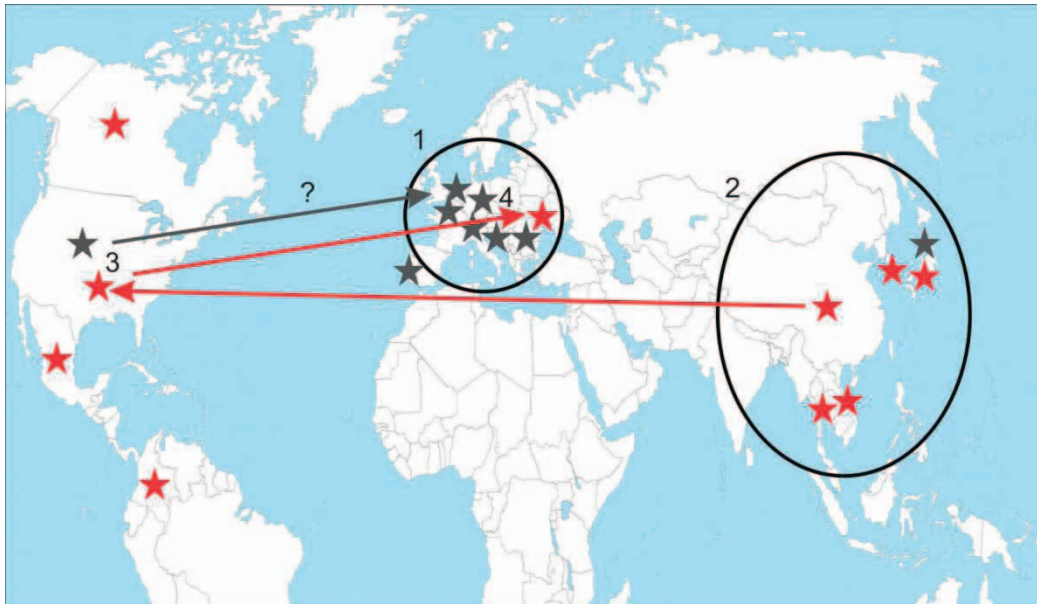
propagiert werden (Hofmann, M. & Wyler 1988) und diente fortwährend als Prototyp zur Erforschung der PED genannten Erkrankung (Pensaert, M. et al. 1982).

Während den 1980er und 1990er Jahren folgten mehrere Ausbrüche innerhalb Europas (Abb. 9(1)), unter anderem in Deutschland, Belgien, Frankreich, Spanien (Carvajal et al. 1995), England, den Niederlanden (Van Reeth & Pensaert 1994), Ungarn (Nagy et al. 1996), der Tschechischen Republik (Smid et al. 1993) und auch in der Schweiz. Daraufhin nahm die Evidenz von PED-Erkrankungen in Europa ab und es konnten nur noch sporadische Ausbrüche beobachtet werden, z. B. 2006 in Italien (Martelli et al. 2008).

In Asien konnte PEDV erstmals 1973 in China nachgewiesen werden (Wang, D. et al. 2016). Ausbrüche traten in vielen asiatischen Ländern, unter anderem in China (Chen, J. F. et al. 2008, Jinghui & Yijing 2005), Japan, Südkorea (Chae et al. 2000), den Philippinen und Thailand (Olanratmanee et al. 2010, Puranaveja et al. 2009) auf und verliefen häufig akuter, dramatischer und mit größeren Saugferkelverlusten als in Europa (Song, D. & Park 2012, Sueyoshi et al. 1995) (Abb. 9(2)). Insbesondere nach 2010 war in Asien ein gehäuftes Auftreten von PED, auch in immunisierten Herden, zu beobachten. Diese Ausbrüche, welche zu großen Saugferkelverlusten und wirtschaftlichen Einbußen aufgrund hoher Morbiditäts- und Mortalitätsraten bis zu 100 % führten, wurden durch neue, hochvirulente PEDV-Varianten verursacht (Lee, S. & Lee 2014, Li, W. et al. 2012, Sun, M. et al. 2015, Sun, R. Q. et al. 2012, Tian, P. F. et al. 2014, Wang, J. et al. 2013) (Abb. 9, rote Sterne). Diese unterschieden sich auf Genomebene durch Mutationen in bestimmten Genen (vor allem S-Gen) von den früheren, klassischen europäischen und asiatischen Isolaten (Diep et al. 2017, Li, W. et al. 2012) (1.2.2.2) und traten abgesehen von China auch in Japan (Masuda et al. 2015), Südkorea und Vietnam (Kim et al. 2015, Vui et al. 2014) und Thailand (Cheun-Arom et al. 2015) auf.

In den USA wurde PEDV erstmals im April 2013 nachgewiesen (Stevenson et al. 2013) (Abb. 9(3)). Hier traten bis März 2018 in 39 Bundesstaaten akute Fälle von PED auf (<https://www.aasv.org/Resources/PEDv/PEDvWhatsNew.php>), welche insbesondere von Beginn des Ausbruchs bis ins Jahr 2014 zu hohen wirtschaftlichen Einbußen führten (Lin et al. 2016). Ähnlich wie bei den asiatischen Ausbrüchen betrug die Mortalität bei Saugferkeln annähernd 100 % (Huang et al. 2013, Stevenson et al. 2013). Die isolierten, hochvirulenten Stämme zeigten eine hohe genetische Übereinstimmung mit zwei chinesischen Stämmen sodass ein asiatischer Ursprung der nordamerikanischen Stämme vermutet wird (Huang et al. 2013, Lin et al. 2016, Tian, P. F. et al. 2014, Vlasova et al. 2014) (1.2.2.2). Auch wenn die genaue Herkunft des Virus bis heute nicht vollständig geklärt ist, ist ein Eintrag in die USA über Tierbewegungen und Importe aus Asien wahrscheinlich. Abgesehen von der

Ausbreitung von PEDV in den USA wurden auch in Kanada, Mexiko und Kolumbien Fälle bestätigt (Vlasova et al. 2014). Neben dem Auftreten hochvirulenter Varianten gab es in den letzten Jahren immer wieder Berichte von klinisch weniger dramatischen Verläufen (Vlasova et al. 2014, Wang, L. et al. 2014). Häufig waren diese Ausbrüche mit PEDV-Stämmen assoziiert, die nach phylogenetischen Analysen einen hohen Verwandtschaftsgrad mit hochvirulenten US-amerikanischen Isolaten aufwiesen, jedoch bestimmte genetische Signaturen im S-Gen beinhalteten, die mit Sequenzen aus älteren europäischen Varianten (z. B. CV777) oder niedriger virulenten asiatischen Stämmen übereinstimmten (Lee, C. 2015, Lin et al. 2016, Vlasova et al. 2014, Wang, L. et al. 2014, Wang, L. et al. 2016). Aufgrund eines spezifischen Musters von Insertionen und Deletionen in der S1-Domäne werden diese Varianten als S-INDEL-Stämme bezeichnet (Abb. 9 graue Sterne) (1.2.2.2). Ähnliche Isolate konnten auch in Asien (Suzuki et al. 2015) (Abb. 9(2)) und Europa (Abb. 9(4)) gefunden werden, unter anderem in Portugal (Mesquita et al. 2015), Österreich, Rumänien (Hanke et al. 2017), Belgien, Frankreich (Grasland et al. 2015), Slowenien und den Niederlanden (Lin et al. 2016) und waren meist mit klinisch milden Verläufen assoziiert. Auch in Deutschland wurden S-INDEL-Stämme nachgewiesen (Hanke et al. 2017, Henniger & Schwarz 2014, Stadler et al. 2015). Hier zeigte sich jedoch eine sehr variable klinische Ausprägung mit Mortalitätsraten von 5,5 bis zu 68 % bei einem hohen Grad an genetischer Übereinstimmung zwischen den einzelnen Stämmen. Auch wenn für einige S-INDEL-Varianten eine niedrigere Virulenz gezeigt werden konnte (Chen, Q. et al. 2016, Leidenberger et al. 2017), scheinen also noch weitere Faktoren, z. B. Herdenimmunität, Herdengesundheit, Management und Biosicherheit den Ausprägungsgrad der Erkrankung zu beeinflussen (Lin et al. 2016, Pensaert, M. B. & Martelli 2016, Stadler et al. 2015). Abgesehen von diesen eher milden Ausbrüchen wurde bereits 2014 in der Ukraine ein akuter, dramatischer PED-Ausbruch beschrieben, welcher durch ein US-amerikanisches hochvirulentes Virus verursacht worden war (Dastjerdi et al. 2015). Da die Gefahr des Eintrags hochvirulenter PEDV-Stämme, welche seuchenhafte Krankheitsausbrüche nach sich ziehen, nach Europa besteht, ist eine erhöhte Wachsamkeit im Hinblick auf den Tierverkehr erforderlich. Ebenso wichtig ist ein erhöhter Forschungsaufwand in Bezug auf Virulenzfaktoren und Vakzineentwicklung, um für einen akuten Ausbruch von PED gerüstet zu sein.



**Abb. 9: Epidemiologie der PED weltweit.** Schwarze Kreise markieren Gebiete mit ersten PED-Ausbrüchen in den 1980er und 1990er Jahren in Europa (1) und Asien (2), die durch klassische Varianten verursacht wurden. In Asien entwickelten sich daraufhin hochvirulente Stämme (★), die den Ursprung (roter Pfeil) für hochvirulente nordamerikanische Varianten (3) bildeten und seit 2013 massive Ausbrüche in Nord- und Südamerika verursachten. Ähnliche Varianten wurden später auch in der Ukraine gefunden (4, roter Pfeil). Außerdem entwickelten sich in den USA, Europa und Asien S-INDEL-Stämme mit niedrigerer Virulenz (★). Hier ist allerdings bisher noch unklar, ob diese Stämme einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung besitzen (grauer Pfeil), oder sich in verschiedenen Ländern aus hochvirulenten Varianten in ähnlicher Form entwickelten.

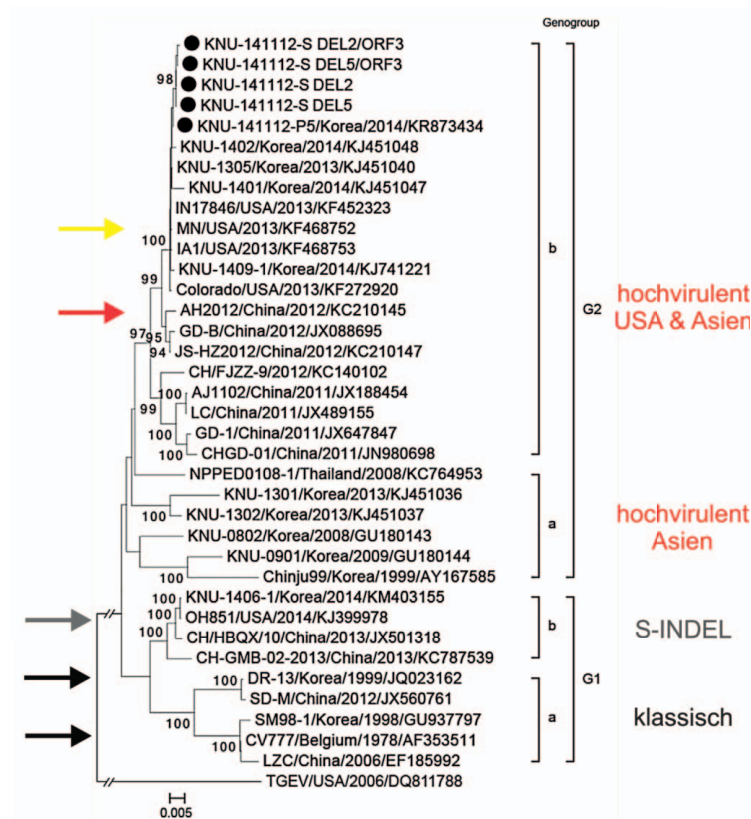
#### 1.2.2.2 Globale Evolution von PEDV-Stämmen

Wie bereits in Kapitel 1.2.3.1 beschrieben wurde die PED in Europa und Asien bis etwa 2010 durch sogenannte „klassische“ PEDV-Stämme verursacht, zu denen in Europa der Prototyp CV777 zählte. In Asien wurde unter anderem der Stamm DR13 beschrieben, welcher nach Zellkulturadaption häufig als attenuierte Lebendvakzine eingesetzt wurde (Park, S. J. et al. 2013, Song, D. & Park 2012, Song, D. S. et al. 2007). Ähnliches gilt für den japanischen Stamm P-5V, der ebenfalls durch Zellkulturpropagation attenuiert wurde (Masuda et al. 2015, Sato et al. 2011, Song, D. et al. 2015, Song, D. & Park 2012). Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen basierend auf der S-Gen-Sequenz konnten diese Viren den klassischen PEDV-Stämmen, auch als *Genogroup 1a* (G1a) bezeichnet, zugeordnet werden (Lee, C. 2015, Lin et al. 2016) (Abb. 10 schwarze Pfeile). Die nach 2010 in Asien und Nordamerika nachgewiesenen pandemischen Stämme werden der *Genogroup 2b* (G2b) bzw. den hochvirulenten amerikanischen und asiatischen Varianten zugeordnet (Lee, C. 2015). Hierzu zählt auch das im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte PEDV Minnesota (MN) (Abb. 10 gelber Pfeil). Als charakteristisches Unterscheidungsmerkmal werden spezifische Insertionen und Deletionen an bestimmten Positionen in der S1-Domäne im Vergleich zur CV777-

Sequenz angesehen, durch welche S-Proteine von G2b-Stämmen 3 Aminosäuren länger sind als solche der klassischen G1a-Viren (Lee, C. 2015, Lee, D. K. et al. 2010). Die Entwicklung der nordamerikanischen Stämme wird auf eine Rekombination zweier asiatischer Stämme, den hochvirulenten Stamm CHN/AH2012 (Abb. 10 roter Pfeil) und den ebenfalls hochvirulenten Stamm CHN/ZMDZY/2011, zurückgeführt (Huang et al. 2013, Lee, C. 2015, Lin et al. 2016, Tian, P. F. et al. 2014, Vlasova et al. 2014). Bestimmte asiatische Stämme, deren S-Gen-Sequenzen G2b zugeordnet werden können, die jedoch noch näher mit klassischen Stämmen verwandt sind, bilden *Genogroup 2a* (G2a) (Lee, C. 2015, Lee, D. K. et al. 2010). Die in Kapitel 1.2.3.1 beschriebenen S-INDEL-Stämme bilden die *Genogroup 1b* (G1b) (Abb. 10 grauer Pfeil). Im Vergleich zu den hochvirulenten G2-Stämmen beinhalten diese eine Aminosäureinsertion (aa 161-162) sowie 2 Deletionen (aa 59-62 und aa 140) in der S1-Domäne, und sind damit auf S-Gen-Ebene näher mit klassischen Stämmen verwandt (Lee, C. 2015, Lin et al. 2016, Oka et al. 2014, Wang, L. et al. 2016). Der Rest des Genoms ähnelt jedoch deutlich den G2-Stämmen (Lin et al. 2016, Vlasova et al. 2014). Ob diese Stämme durch Rekombinationsereignisse (Wang, L. et al. 2014) oder unter Selektionsdruck entstanden sind ist bisher noch unklar (Lin et al. 2016). Da S-INDEL Stämme bereits in der Frühphase der PED-Epidemie in den USA bzw. in Asien bereits vor 2010 isoliert werden konnten (Pensaert, M. B. & Martelli 2016) und diese ähnliche genetische Signaturen im S-Gen wie klassische Stämme tragen, wird vermutet dass die beschriebenen Modifikationen ein stabiles Muster repräsentieren, welches durch einen weniger virulenten Phänotyp eine endemische Persistenz in Schweinebeständen ermöglicht (Vlasova et al. 2014).

Abgesehen von den nach diesem Schema klassifizierten Stämmen gab es immer wieder Berichte von Varianten, die sich insbesondere durch Modifikationen im S-Gen von den typischen klassischen oder hochvirulenten Stämmen unterschieden. In Korea (Park, S. et al. 2014), Japan (Murakami et al. 2015) und auch in den USA (Zhang, J. et al. 2018) wurden Feldstämme mit großen Deletionen von etwa 200 Aminosäuren im S-Protein nachgewiesen. Eine ähnliche Deletion entwickelte sich in einem US-Stamm in Zellkultur (Oka et al. 2014). Diese Varianten stellten sich *in vivo* attenuiert dar (Hou et al. 2017, Lin et al. 2016, Suzuki et al. 2016, Zhang, J. et al. 2018). Eine neuere Studie zeigte eine Koexistenz von multiplen Varianten, unter anderem mit großen Deletionen im S-Gen, in einem Wirt (Diep et al. 2017). Ein Zusammenhang zur Persistenz des Virus in Schweinebeständen wird vermutet. Des Weiteren konnten sowohl in Italien (Boniotti et al. 2016) als auch in Deutschland TGEV-PEDV-Chimären nachgewiesen werden (Akimkin et al. 2016). Dies verdeutlicht die Anfälligkeit des Coronavirusgenoms für Rekombinationen und Mutationen, die eine korrekte Diagnose des Krankheitserregers erschweren können. Die Möglichkeit der Entstehung neuer

Viren und Varianten mit unterschiedlicher Virulenz sollte daher bei Diagnostik und Impfstoffentwicklung immer beachtet werden.



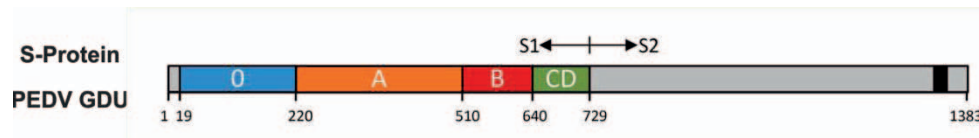
**Abb. 10: Phylogenetische Analyse globaler PEDV-Stämme basierend auf der Nukleotidsequenz des S-Gens.** Ein gelber Pfeil zeigt den Stamm MN, ein roter Pfeil zeigt die asiatische Variante CHN/AH2012, aus welcher durch Rekombination mit CHN/ZMDZY/2011 hochvirulente US-Stämme entstanden sind, ein grauer Pfeil zeigt einen amerikanischen S-INDEL-Stamm (OH851). Der Prototyp CV777 und der asiatische klassische Stamm DR13 werden mit schwarzen Pfeilen gezeigt (Abb. modifiziert nach Lee et al. 2017).

## 1.2.3 Virulenzfaktoren von PEDV

### 1.2.3.1 Das PEDV S-Protein

Bei dem S-Protein von PEDV handelt es sich wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben um ein glykosyliertes Klasse I-Fusionsprotein, das wie bei allen Coronaviren den Eintritt in die Zelle vermittelt und somit auch das Hauptziel neutralisierender Antikörper darstellt (Sun, D. B. et al. 2007). Es besteht aus einem Signalpeptid, der rezeptorbindenden S1- Untereinheit und der S2-Fusionsdomäne, welche neben einem Fusionsprotein 2 *Heptad-Repeat*-Regionen (HR1 und HR2) sowie eine Transmembrandomäne (TMD) beinhaltet (Li, C. et al. 2017) (Abb. 11). Mittels Kryoelektronenmikroskopie konnte in neuesten Studien die S-Protein-Struktur von Alpha- und Betacoronavirusspikes bestimmt werden (Kirchdoerfer et al. 2016, Walls et al. 2016a, Walls et al. 2016b). Dabei wurden 4 Domänen (A-D) innerhalb der S1-Untereinheit

identifiziert, welche von Li et al. auf das PEDV-S-Protein übertragen werden konnten (Li, C. et al. 2017). Abb. 11 zeigt eine schematische Darstellung der Domänen im S-Protein.



**Abb. 11: Domänen innerhalb des S-Proteins.** Das S-Protein des asiatischen PEDV Stammes GDU (G2b) mit Signalpeptid (1-19), S1- und S2-Untereinheit sowie Transmembrandomäne (schwarzes Rechteck) ist dargestellt. Die S1-Untereinheit beinhaltet die Domänen S1<sup>0</sup>, S1<sup>A</sup>, S1<sup>B</sup>, S1<sup>C</sup> und S1<sup>D</sup>. Aminosäurepositionen sind mit Zahlen angegeben (Abb. modifiziert nach Li, C. et al. 2017).

Die C-terminal gelegene S1<sup>B</sup>-Domäne (S1<sup>B</sup>) fungiert dabei als Rezeptorbindungsdomäne für die meisten Coronaviren (Kirchdoerfer et al. 2016, Walls et al. 2016a, Walls et al. 2016b). Für PEDV wurde eine Interaktion von S1<sup>B</sup> mit pAPN vermutet (Deng, F. et al. 2016), allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um einen funktionellen Rezeptor handelt (Ji et al. 2018, Li, W. et al. 2017, Shirato et al. 2016). Ähnlich wie das TGEV-S-Protein beinhaltet das S-Protein von PEDV noch eine zusätzliche S1<sup>0</sup>-Domäne (S1<sup>0</sup>) (Abb. 11) am N-Terminus der S1-Untereinheit, welche für die Bindung an Sialinsäuren (Reguera et al. 2011) (1.1.4) und die daraus resultierende Enteropathogenität verantwortlich ist (Krempl & Herrler 2001, Krempl et al. 1997, Shahwan et al. 2013). Die PEDV-S1<sup>0</sup>-Domäne ist sehr variabel und enthält Bereiche, in denen die bei S-INDEL-Stämmen beschriebenen Modifikationen liegen (Li, C. et al. 2017) (1.2.2). Solche Mutationen sind neueren Studien zufolge mit einer Änderung der Bindungsaktivität an Sialinsäuren assoziiert (Deng, F. et al. 2016, Hou et al. 2017, Li, W. et al. 2016, Liu, C. et al. 2015). Diese Erkenntnisse lassen im Zusammenhang mit den spezifischen Differenzen im S-Protein von hochvirulenten pandemischen Stämmen und klassischen sowie meist schwachvirulenten S-INDEL-Stämmen eine Beteiligung des S-Proteins als Virulenzfaktor wahrscheinlich erscheinen. Neueste, mittels reverser Genetik generierte Daten unterstützen diese Hypothese. Hier konnten hochvirulente Viren durch Deletionen bzw. Austausch von S-Genen teilweise attenuiert werden (Hou et al. 2017, Wang, D. et al. 2018). Das S-Protein beinhaltet weiterhin wichtige neutralisierende Epitope innerhalb der S1<sup>0</sup>- Domäne (aa 19-220), der S1<sup>B</sup>-Domäne (CO-26K-Äquivalent, aa 499-638) sowie an der S1-S2-Grenze. Des Weiteren wurden 2 B-Cell-Epitope in der S2-Untereinheit (SS2 aa 748-755 und SS6 aa 764-771) und ein Epitop am C-Terminus des Proteins (aa 1368-1374) beschrieben (Chang et al. 2002, Ge et al. 2012, Kang, T. J. et al. 2005, Li, C. et al. 2017, Lin et al. 2016, Oszvald et al. 2007, Sun, D. et al. 2008, Sun, R. et al. 2014).

### 1.2.3.2 Das akzessorische Protein 3

Typischerweise beinhalten Viren der Familie *Coronaviridae* in ihrem Genom zwischen Gen S und E einen konservierten, für akzessorische Proteine kodierenden ORF. Im Gegensatz zu vielen anderen Coronaviren besitzt PEDV an dieser Position einen einzelnen, vollständigen ORF (Wang, K. et al. 2012, Zeng et al. 2004) (1.1.3 Abb. 4). Es konnte gezeigt werden, dass das durch ORF3 kodierte akzessorische Protein 3 von PEDV *in vitro* ähnlich wie bei SARS-CoV (Lu et al. 2006) eine Ionenkanalfunktion aufweist (Wang, K. et al. 2012). Interessanterweise tritt nach Zellkulturadaptation von PEDV meist eine spezifische Deletion von 49-51 Nukleotiden innerhalb dieses Gens auf (Park, S. J. et al. 2008, Wang, K. et al. 2012), welche in einem trunkierten Protein ohne Ionenkanalaktivität (Wang, K. et al. 2012) resultiert. Viele früher verwendeten Lebendvakzinen, die durch fortlaufende Passagierung auf Vero-Zellen entstanden waren, beinhalten diese Mutation (1.2.5). Da diese Viren *in vivo* attenuiert sind, wurde ein Zusammenhang zwischen ORF3 und der Virulenz von PEDV vermutet (Lee, S. et al. 2017, Park, S. J. et al. 2008). Allerdings hatte eine Substitution von ORF3 durch ein Reportergen mittels reverser Genetik nur eine geringe Auswirkung auf die Virulenz von PEDV (Beall et al. 2016). Andererseits wird vermutet, dass Mutationen in diesem Gen mehr mit Zellkulturadaptation als mit Attenuierung *in vivo* assoziiert sind. Die Rolle von ORF3 in der PED-Pathogenese bleibt somit offen (Chen, F. et al. 2016).

Weiterhin wird ein Einfluss von Gen 3 auf die Virusproduktion in Zellkultur kontrovers diskutiert. Zwar konnten Wang et al. zeigen, dass eine Ausschaltung dieses Gens bei Wildtyp-Viren zu einer verringerten Anzahl von Nachkommenvirionen führt, während dies bei einem trunkierten Gen 3 nicht der Fall ist (Wang, K. et al. 2012). Bestimmte Sequenzmuster in ORF3 sollen allerdings die Replikation *in vitro* unterdrücken (Li, C. et al. 2013, Wongthida et al. 2017), sodass die Propagation dieser Viren erst durch Mutationen in Gen 3 ermöglicht wird (Li, C. et al. 2013). Da ein intaktes Gen 3 für die Kultivierung auf wirtsfremden Vero-Zellen nicht erforderlich ist (Lee, S. et al. 2017, Li, C. et al. 2013) und aus Schweinen bisher nur Viren mit intaktem ORF3 isoliert wurden, wird eine essentielle Funktion dieses Gens *in vivo* vermutet (Wongthida et al. 2017).

### 1.2.4 Zellkulturpropagation von PEDV

Versuche zur Isolierung von PEDV-Feldviren in Zellkultur waren lange Zeit erfolglos (Dea et al. 1985, Hess et al. 1980, Pensaert, M. & De Bouck 1978, Witte et al. 1981) und stellen auch heute noch eine Herausforderung dar (Chen, Q. et al. 2014, Oka et al. 2014). Erstmals gelang die Isolation von PEDV im Jahr 1988 auf Vero-Zellen durch Hofmann & Wyler. Ausschlaggebend für den Erfolg war hier der Zusatz von Trypsin zum Kulturmedium (Hofmann, M. & Wyler 1988). Später gelang es, PEDV auch auf einigen Schweinzelllinien,



vorwiegend Nierenepithelzellen, in Gegenwart von Trypsin zu propagieren (Kadoi et al. 2002, Kusanagi et al. 1992, Shibata et al. 2000). Eine Kultivierung auf primären fetalen Schweinezellen scheiterte jedoch meist an der Trypsinempfindlichkeit dieser Zellen (Hofmann, M. & Wyler 1988, Kusanagi et al. 1992). Wegen ihrer hohen Trypsintoleranz und Permissivität für das Virus werden auch heute noch standardmäßig Vero-Zellen für die Kultivierung von PEDV eingesetzt.

Zur Aktivierung der Fusionsaktivität muss das PEDV-S-Protein nach Rezeptorbindung proteolytisch gespalten werden, um in die Zielzelle zu gelangen (Li, W. et al. 2016, Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011, Wicht et al. 2014) (1.1.4). Dies ist ebenfalls erforderlich, um eine Freisetzung neu gebildeter Virionen und eine Synzytienbildung zu erreichen (Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011). Die Spaltung des S-Proteins kann durch extrazelluläre Proteasen, wie das natürlicherweise im Verdauungstrakt von Schweinen vorkommende Trypsin, erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch lysosomale Cysteinproteasen (Cathepsine) und Transmembran-Serin-Proteasen (TMPRSS) eine Infektion mit PEDV ermöglichen (Liu, C. et al. 2016, Shirato et al. 2011). Einige zellkulturadaptierte PEDV-Stämme konnten erfolgreich ohne Trypsinzusatz kultiviert werden (Kadoi et al. 2002, Li, W. et al. 2016, Park, J. E. et al. 2011, Wicht et al. 2014). Frühere Studien machten eine Mutation innerhalb der S2'-Schnittstelle (aa 890) (1.1.4) für den trypsin-unabhängigen Phänotyp verantwortlich (Wicht et al. 2014). Aktuelle Sequenzvergleiche zwischen trypsin-abhängigen und trypsin-unabhängigen Stämmen deuten allerdings auf eine Mutation an Aminosäureposition 977 im S-Protein als Determinante für die Trypsinabhängigkeit hin (Sun, M. et al. 2017). Um die Relevanz einer Spaltung des S-Proteins für den Eintritt von PEDV in die Zielzelle zu demonstrieren, wurde eine Furin-Schnittstelle an der S2'-Position eingeführt, wodurch eine, wenn auch weniger effektive, trypsin-unabhängige Infektion erreicht wurde (Li, W. et al. 2015).

Diese Ergebnisse weisen auf das Erfordernis einer Spaltung des S-Proteins durch intestinale Proteasen für eine produktive Infektion von Schweinen hin. Das Vorkommen dieser Proteasen im Tier ist daher höchstwahrscheinlich entscheidend für den Gewebstropismus des Virus (Li, W. et al. 2016).

### **1.2.5 PEDV-Vakzinen**

Da keine kausale Therapie für PED zur Verfügung steht und eine symptomatische Behandlung bei akuten Verläufen nur selten Erfolg verspricht, ist eine Prophylaxe essentiell, um eine weitere Ausbreitung des Virus zu verhindern und wirtschaftliche Verluste zu minimieren. Von dramatischen Ausbrüchen mit hohen Mortalitätsraten sind vor allem Saugferkel betroffen, sodass eine Muttertierimpfung erforderlich ist, um durch

Kolostrumaufnahme eine adäquate passive Immunität neugeborener Ferkel zu gewährleisten (Chattha et al. 2015, Langel et al. 2016, Song, D. & Park 2012). Bei der Impfstoffentwicklung gilt zu bedenken, dass für die Verhinderung einer Virusaufnahme in intestinale Epithelzellen vor allem eine lokale, mukosale Immunität in Form von IgA erforderlich ist. Diese kann am besten durch eine orale Immunisierung der Muttersauen mit attenuierten Lebendvakzinen erreicht werden (Chattha et al. 2015, Langel et al. 2016, Song, D. & Park 2012). Aus diesem Grund wurde sowohl in früheren Zeiten als auch während der PED-Epidemie in den USA ein sogenanntes „*Feedback*“-Konzept angewendet, bei dem durch Exposition naiver Herden gegenüber infektiösem Material eine Immunität erreicht werden sollte. Dieser Ansatz war zwar teilweise erfolgreich (Goede & Morrison 2016), durch Nachteile wie eine inhomogene Verteilung der Viren, Inaktivierung durch unsachgemäße Lagerung oder eine hohe Virusausscheidung durch zu hohe Infektionsdosen unterliegt diese Art der Immunisierung jedoch im Vergleich mit kommerziell erwerblichen Vakzinen (Langel et al. 2016, Lin et al. 2016, Song, D. & Park 2012). Aufgrund der sinkenden Inzidenz von PEDV innerhalb Europas war die Impfstoffentwicklung seit den 1990er Jahren vorwiegend auf Asien beschränkt (Langel et al. 2016). Hier kamen überwiegend attenuierte Lebendvakzinen zum Einsatz, welche durch fortlaufende Passagierung in Zellkultur entstanden waren (1.2.2.2), z. B. KPEDV-9 (93 Passagen) in Korea (Kweon et al. 1999), der attenuierte DR13-Stamm (100 Passagen) in Südkorea (Song, D. S. et al. 2007) oder P-5V in Japan (Langel et al. 2016, Song, D. & Park 2012). Das Auftreten von hochvirulenten PEDV-Varianten in vakzinierten Herden nach 2010 zeigte jedoch eine verminderte Protektivität der auf klassischen Varianten basierenden Impfstoffe gegenüber den pandemischen Stämmen (Jung & Saif 2015, Langel et al. 2016, Li, W. et al. 2012, Song, D. et al. 2015). Auch wenn nur ein PEDV-Serotyp existiert (Lin et al. 2016, Pensaert, M. 1999), scheinen sich die hochvirulenten Stämme antigenetisch von klassischen Stämmen zu unterscheiden. Diese These wird durch Beobachtungen im Feld und durch Sequenzunterschiede in Bereichen mit neutralisierenden Epitopen innerhalb des S-Gens unterstützt und ist bei der Entwicklung von Impfstoffen zu beachten (Chiou et al. 2017, Li, R. et al. 2014, Lin et al. 2015, Tian, Y. et al. 2013) (1.2.2.2, 1.2.3.1). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Grad an Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen das S-Protein klassischer und pandemischer Stämme besteht (Kim et al. 2015, Lin et al. 2016, Song, D. et al. 2015, Wang, X. et al. 2016). S-INDEL-Stämme dagegen beinhalten in neutralisierenden Epitopen meist die gleichen Aminosäuresequenzen wie hochvirulente, pandemische Stämme. Da sie außerdem häufig nur geringgradig virulent sind, wären S-INDEL-Stämme geeignete Vakzinekandidaten. Diese Hypothese wurde bereits in klinischen Studien untersucht. In serologischen Tests konnte eine Kreuzreaktivität zwischen S-INDEL- und pandemischen Stämmen gezeigt werden (Lin et al. 2015, Okda et al. 2017), allerdings waren mit S-INDEL-

Stämmen immunisierte Tiere *in vivo* nur partiell gegen Infektionen mit hochvirulenten Varianten geschützt (Annamalai et al. 2017, Lin et al. 2016, Opriessnig et al. 2017).

In den USA sind aktuell mehrere kommerzielle Vakzinen verfügbar. Hierbei handelt es sich um Totimpfstoffe, basierend auf dem S-Gen (Merck) oder inaktiviertem Virus (Zoetis). Durch diese Vakzinen kann die Ferkelmortalität zwar reduziert, Verluste und Ausbrüche jedoch nicht vollständig vermieden werden (Crawford et al. 2016, Lin et al. 2017). Attenuierte Lebendvakzinen induzieren vermutlich eine bessere laktogene Immunität (Chattha et al. 2015). Sie beinhalten jedoch die Gefahr der Rekombination mit Feldstämmen und der Entstehung neuer, virulenterer PEDV-Varianten (Chen, J. et al. 2010).

### 1.2.6 Reverse Genetik bei PEDV

Revers-genetische Systeme sind wertvolle Werkzeuge für die Erforschung der molekularen Pathogenese der PED, da sie die Einführung definierter Mutationen in das virale Genom erlauben und die Untersuchung ihres Einflusses auf die Entwicklung der Krankheit *in vivo* ermöglichen.

Bisher wurden für PEDV 6 revers-genetische Systeme beschrieben. Das erste System wurde 2013 für den zellkultur-adaptierten Stamm DR13 beschrieben und basiert auf gezielter RNA-Rekombination („*targeted RNA recombination*“) (Li, C. et al. 2013). Mithilfe dieses Ansatzes konnte gezeigt werden, dass ein intakter ORF3 für die Replikation in Zellkultur nicht notwendig ist und dass das PEDV-Genom die Insertion und Expression von Reportergenen toleriert. Obwohl durch dieses System wichtige Erkenntnisse gewonnen wurden, ist es technisch limitiert, da die gezielte RNA-Rekombination nur die Manipulation eines etwa 8 kb großen Bereiches am 3'-Ende des Genoms erlaubt (Teeravechyan et al. 2016).

Weitere revers-genetische Systeme für PEDV basieren auf einem künstlichen *E. coli* Bakterienchromosom (BAC = „*bacterial artificial chromosome*“) als Vektor. Mit dieser Technik wurde ein cDNA-Klon des thailändischen Stammes AVCT12 etabliert und Jengarn et al. gewannen die Erkenntnis, dass ein intakter ORF3 sich möglicherweise negativ auf die Replikation von PEDV in Zellkultur auswirkt (Jengarn et al. 2015, Wongthida et al. 2017). Auch für chinesische Feldisolate, den hochvirulenten Stamm BJ2011C sowie den schwachvirulenten Stamm CHM2013 (Li, J. et al. 2017), konnten BAC-Systeme generiert werden. Auch wenn diese Plattformen eine Modifikation des gesamten PEDV-Genoms erlauben und so bereits erste Erkenntnisse für den Einfluss des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV gewonnen werden konnten (Wang, D. et al. 2018) (1.2.3.1), sind BAC-Systeme

häufig durch die Instabilität und Toxizität bestimmter Gene in Bakterien limitiert (Casais et al. 2001, Teeravechyan et al. 2016).

Für US-Feldisolate ist bisher nur ein revers-genetisches System bekannt, welches auf Herstellung eines cDNA-Klons durch *In-vitro*-Ligation beruht (Beall et al. 2016). Basierend auf dieser Plattform konnten bereits erste Rückschlüsse auf die Bedeutung von ORF3 und S-Protein als Virulenzfaktoren gewonnen werden (Beall et al. 2016, Hou et al. 2017). Auch für das chinesische Isolat AH2012 konnte ein cDNA-Klon mittels *In-vitro*-Ligation erzeugt werden (Fan et al. 2017). Technische Limitationen des Systems bestehen in der relativ geringen Effizienz bei der Gewinnung rekombinanter Viren. Um einen für folgende Experimente ausreichenden Virustiter zu erzielen, sind weitere Passagen des Virus in Zellkultur nötig. Da RNA-Viren inklusive Coronaviren eine relativ hohe Mutationsrate besitzen, besteht hierbei das Risiko, dass unerwünschte Modifikationen im Coronavirusgenom auftreten können.

Die oben beschriebenen Nachteile können mithilfe eines Vaccinia Virus-basierten revers-genetischen Systems umgangen werden. Obwohl sich derartige Systeme bereits als stabile Vektoren zur Herstellung rekombinanter Coronaviren erwiesen haben (Casais et al. 2001, Coley et al. 2005, Florek et al. 2017, Tekes et al. 2010, Tekes et al. 2008, Tekes et al. 2012, Thiel et al. 2001), wurde für PEDV bisher noch keine Vaccinia Virus-basierte Plattform generiert (Teeravechyan et al. 2016). Diese Technologie ermöglicht die stabile Integration der genomlangen cDNA in einen viralen Vektor sowie die Einführung definierter Mutationen an jeder Position in der PEDV-cDNA (Teeravechyan et al. 2016). Da hochtitrige Virusstocks ohne weitere Zellkulturpassagen generiert werden können, repräsentiert dies ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung der molekularen Pathogenese der PED.

### **1.2.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung eines Vaccinia Virus-basierten revers-genetischen Systems für ein hochvirulentes, nordamerikanisches PEDV-Feldisolat, welches das Studium der molekularen Pathogenese der PED ermöglicht. Von Interesse war hier die Identifizierung viraler Virulenzfaktoren und biologischer Marker zur Differenzierung von hoch- und schwachvirulenten Stämmen. Als Langzeitziele sind die Etablierung neuer diagnostischer Verfahren zur Unterscheidung von hoch- und schwachvirulenten Varianten sowie die Vakzineentwicklung zu nennen.

Zu diesem Zweck wurde eine cDNA, basierend auf der PEDV-MN-Datenbanksequenz, in den Vaccinia Virus-Vektor eingeführt.

Durch Manipulation der PEDV-cDNA wurden kritische Nukleotide innerhalb der 5'UTR und Aminosäuren im S-Protein identifiziert, die ausschlaggebend für einen erfolgreichen *Rescue* und die Zellkulturpropagation von rekombinanten PEDVs sind.

Anschließend wurde die Virulenz des rekombinanten PEDV MN *in vivo* geprüft. Durch Modifikation des S-Gens sowie ORF3 und den Einsatz der generierten Viren in Tierexperimenten wurde der Einfluss dieser Gene auf die Virulenz von PEDV untersucht.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

##### 2.1.1.1 Eukaryotische Zellen

BHK-21-Zellen (*baby hamster kidney*)

ATCC® Nummer: CCL-10™

BHK-Tet/ON-Zellen (BHK-Zelllinie mit Tet/ON-System)

N. Tautz, Universität Lübeck,  
Deutschland

BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N (BHK-Zelllinie, die das N-Protein des  
PEDV Isolates Minnesota über das Tet/ON-  
System exprimiert)

Institut für Virologie, Gießen

CV-1-Zellen (Affennieren-Fibroblastenzellen)

ATCC® Nummer: CCL-70™

D980R-Zellen

G. L. Smith, Imperial College,  
London, Großbritannien

Vero-Zellen (Affennieren-Epithelzellen)

Institut für Virologie, Gießen

##### 2.1.1.2 Prokaryotische Zellen

*E. coli* Stamm HB101 K-12

Institut für Virologie, Gießen

#### 2.1.2 Viren

PEDV Stamm CV777

bereitgestellt von Mathias Ackermann (Institut für Virologie,  
Zürich, Schweiz)

PEDV Stamm NPL2013

(GenBank

Akzessionsnummer

KM052365)

bereitgestellt von Volker Thiel (Institut für Virologie und  
Immunologie, Bern, Schweiz)

Vacciniavirus vNotl/tk

beschrieben in Thiel et al. 2001

#### 2.1.3 Plasmide

pGEM® -T		Promega
p-GPT-1		beschrieben in Hertzog et al. 2004
pTREhyg		Institut für Virologie, Gießen

p1	Vektor: pUC57 Insert: Vacciniavirus vNotI/tk Nukleotid (nt) 113832-113993; T7-Promotor-Sequenz; PEDV MN nt 1-3500	Genscript, Piscataway, USA
p2	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 3001-7000	Genscript, Piscataway, USA
p3	Vektor: pCC1 Insert: PEDV MN nt 6500-10500	Genscript, Piscataway, USA
p4	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 10050-13017	Genscript, Piscataway, USA
p5	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 13009-17000	Genscript, Piscataway, USA
p6	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 16501-20500	Genscript, Piscataway, USA
p7	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 20000-23999	Genscript, Piscataway, USA
p8	Vektor: pUC57 Insert: PEDV MN nt 23551-28038; Poly-A-Schwanz; <i>NotI</i> -Schnittstelle; Hepatitis Delta Ribozym-Sequenz (HDR)	Genscript, Piscataway, USA

#### 2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
Phusion High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
Expand Reverse Transcriptase	Roche
RNase-freie DNase RQ1	Promega
RNaseOUT (RNase-Inhibitor)	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Genecraft
T4-DNA-Ligase	NEB
Trypsin	Sigma-Aldrich

## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Primärantikörper

ANTI-FLAG® M2	gegen das FLAG-Epitop DYKDDDDK gerichteter muriner monoklonaler Antikörper (mAK); Sigma-Aldrich
anti-PEDV-N	muriner mAK gerichtet gegen das N-Protein von PEDV Stamm CV777; bereitgestellt von Mathias Ackermann (Institut für Virologie, Zürich, Schweiz)
anti-PEDV-S2	muriner mAK gerichtet gegen die S2 Domäne des S-Proteins von PEDV Stamm CV777; bereitgestellt von Mathias Ackermann (Institut für Virologie, Zürich, Schweiz)

### 2.1.5.2 Sekundärantikörper

Ziege anti-Maus IgG-PO	Dianova; mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter capriner polyklonarer Antikörper (pAK) gerichtet gegen murines IgG
Ziege anti-Maus IgG-cy™3	Jackson; mit Cyanine Cy™3 konjugierter capriner pAK gerichtet gegen murines IgG

## 2.1.6 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 40 %	Carl Roth
Agarose für Elektrophorese	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth
Bacto Agar	Becton Dickinson
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Fluka
Chloroform	Carl Roth
Cap-Analog (m7G(5')ppp(5')G)	NEB
Carboxymethylcellulose (CMC)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTPs)	Roche



Doxycyclin	Gibco
Ethylenamin-N, N, N, N-tetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Ethanol (vergällt 96 %, reinst)	Carl Roth
Ethanol ( $\geq 99,5$ %, reinst)	Carl Roth
Ethidiumbromid 1%ige Lösung	Fluka
Formalin (Formaldehydlösung 37%ig)	Carl Roth
Glycerin (87 %)	Sigma-Aldrich
G418-Sulfat (Neomycin)	Calbiochem
Hygromycin B Gold	InvivoGen
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Lithiumchlorid 7,5 M Lösung	Ambion
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Frema
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Carl Roth
Mycophenolsäure (MPA)	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth

Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
NP-40 (Nonident® P40)	Fluka
Orange G	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
Penicillin/Streptomycin	Carl Roth
Phenol	Carl Roth
Roti® Blot A (10X)	Carl Roth
Roti® Blot K (10X)	Carl Roth
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich
Saccharose	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Serva
Tween-20	Sigma-Aldrich
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer
Xanthin	Sigma-Aldrich

### **2.1.7 Kits**

Expand Reverse Transcriptase Kit	Roche
FirstChoice® RLM-RACE Kit	Ambion
GenElute Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
GenElute Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich
GenElute PCR Clean-up Kit	Sigma-Aldrich

pGEM <sup>®</sup> -T Vector System	Promega
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RiboMAX <sup>™</sup> Large Scale RNA Production System-T7	Promega
Total RNA Kit, peqGOLD	Peqlab

## 2.1.8 Nährmedien

### 2.1.8.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium	10 g/l NaCl; 6 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton in H <sub>2</sub> O; pH 7,5
LB-Agarplatten	1,5 % Bacto Agar in LB-Medium

Transformierte Bakterien wurden durch Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) zum LB-Medium bzw. den LB-Agarplatten selektiert.

### 2.1.8.2 Zellkulturmedien

Hausmedium (CCM 34)	4,5 g/l DMEM-Pulver; 200 µM L-Alanin; 225 µM L-Aspartat; 933 µM Glycin; 510 µM L-Glutamat; 217 µM L-Prolin; 184 µM Hypoxanthin; 0,1 mg/l Biotin; 44 mM NaHCO <sub>3</sub> ; sterilfiltriert
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Gibco

### 2.1.8.3 Zellkulturzusätze

Doxycyclin-Stocklösung	2 mg/ml Doxycyclin in Aqua dd.
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
G418-Stocklösung	50 mg/ml G418-Sulfat in Aqua dd.
Hygromycin-Stocklösung	100 mg/ml Hygromycin in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
Penicillin/Streptomycin Stocklösung	500X- 50000 IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat in Aqua dd.

Trypsin-EDTA-Lösung	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O; 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 g/l Trypsin; 1,23 g/l EDTA; 0,16 g/l Phenolrot in Aqua dd.
Trypsin-Stocklösung	2 mg/ml Trypsin in CCM34

#### 2.1.8.4 Zellkulturzusätze für das revers-genetische System

Hypoxanthinlösung	10 mg/ml Hypoxanthin in 0,1 M NaOH; sterilfiltriert
Mycophenolsäurelösung	10 mg/ml MPA in 0,1 M NaOH; sterilfiltriert
6-Thioguaninlösung	1 mg/ml 6-TG in 0,1 M NaOH; sterilfiltriert
Xanthinlösung	10 mg/ml Xanthin in 0,1 M NaOH; sterilfiltriert

#### 2.1.8.5 Nährmediumzusammensetzung für die einzelnen Zelllinien

BHK-21, Vero	CCM34 mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml)
BHK-PEDV <sub>MN</sub> -N	CCM34 mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml), G418 (0,1 mg/ml) und Hygromycin (0,3 mg/ml)
CV-1, D980R	MEME mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml)

#### 2.1.9 Lösungen und Puffer

##### 2.1.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

dNTP-Mix für PCR	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP gelöst in Aqua dd., Lagerung bei -20 °C
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	0,8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,27 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O in Aqua dd.

##### 2.1.9.2 Lösungen und Puffer für Agarosegelelektrophorese

DNA-Auftragepuffer (5X)	0,25 % Orange G in Aqua dd mit 30 % Glycerin
GeneRuler 1 kb Plus DNA- Ladder	Thermo Fisher Scientific
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Quantitas DNA Marker	Biozym
modifizierter TAE-Puffer (50X) für	2 M TRIS; 1 M Essigsäure; 5 mM EDTA in Aqua dd.;

DNA-Gelelektrophorese	pH 8,0
MOPS-Puffer (10X) für RNA-Gelelektrophorese	200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7; lichtgeschützt gelagert bei 4 °C
RNA Loading Dye (2X)	NEB

### 2.1.9.3 Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung und –Aufreinigung

DNase-Puffer (10X)	400 mM TRIS-HCl (pH 8); 100mM MgSO <sub>4</sub> ; 10 mM CaCl <sub>2</sub> in Aqua dd.; sterilfiltriert
Ethanol 70 %	70 % Ethanol (v/v) in Aqua dd.
Proteinase-K-Puffer (2X)	400 mM NaCl; 200 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS in Aqua dd.; sterilfiltriert
Puffer A	1 mM EDTA (pH 8); 10 mM TRIS in Aqua dd.; autoklaviert; gelagert bei 4 °C

### 2.1.9.4 Lösungen und Puffer für indirekte Immunfluoreszenz

Paraformaldehydlösung	4% PFA in Aqua dd.
PBSAT für Immunfluoreszenz	PBS mit 0,1 % Triton X-100 und 1 % BSA

### 2.1.9.5 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot

Anodenpuffer für SDS-PAGE	0,2 M TRIS; pH 8,9
Anodenpuffer für WB-Transfer	10 % Roti <sup>®</sup> Blot A; 20% Methanol (v/v in Aqua dd.
Blocking-Lösung für WB	5 % Milchpulver in PBST
Jagow Gelpuffer (3X)	3 M TRIS; 0,3 % SDS (w/v); pH 8,45
Kathodenpuffer für SDS-PAGE	0,1 M TRIS; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,25
Kathodenpuffer für WB-Transfer	10 % Roti <sup>®</sup> Blot K; 20% Methanol (v/v) in Aqua dd.
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
Radio-Immuno-Präzipitations-Puffer (RIPA-Puffer)	150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % Natriumdeoxycholat (w/v); 0,1 % SDS (w/v), 50 mM TRIS; pH 8,0; gelagert bei 4 °C
SDS-Auftragepuffer (2X)	2 % (w/v) SDS; 6 M Urea, 10 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

### 2.1.9.6 Medien und Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien

LB <sup>++</sup> -Medium	20 mM MgSO <sub>4</sub> und 10 mM KCl in LB-Medium
Transformationspuffer I (TFBI)	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % Glycerin (v/v) in Aqua dd.
Transformationspuffer II (TFBII)	75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 15 % Glycerin (v/v) in Aqua dd.

### 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	VWR
Filterpapier	Whatman
Kryoröhrchen	Nalgene
MagNA Lyser Green Bead Tubes	Roche
Nitrilhandschuhe	VWR
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe, VWR
Pipettenspitzen	VWR
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe
Plastikpipetten (10 ml und 25 ml)	Brand, Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Röntgenfilm	Advansta
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm und 0,45 µm)	Fischerbrand
Zellkulturplatten und -schalen	BD, Greiner, Nunc, Sarstedt
Zellschaber	Corning
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner

### 2.1.11 Geräte

Analysewaage	Mettler-Toledo
Bakterienschüttler	Werkstatt    Mehrzweckinstitut    der    JLU

	Gießen
Bakterieninkubator	Heraeus
Digitaldrucker Mitsubishi P95	Mitsubishi
Einkanal-Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Brand, Gilson
Elektrophoresegelkammern	Werkstatt Mehrzweckinstitut der JLU Gießen
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Tec-Lab
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35	Zeiss
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments
Glaspipetten	MAGV
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C)	Bosch, Liebherr, Thermo Fischer Scientific
Heizblöcke	Werkstatt Mehrzweckinstitut der JLU Gießen
Kryo-Einfriergerät (Mr. Frosty)	Nalgene
Kühlschränke	Bosch, Liebherr
Kühlzentrifugen Heraeus Fresco 21, Heraeus Megafuge 16R, Biofuge Fresco	Heraeus, Thermo Fisher Scientific
Lichtmikroskop Leica DM-IL	Leica
MagNA Lyser Instrument	Roche
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Minishaker MS1	IKA Labortechnik
NanoVue Spectrophotometer	GE Healthcare
pH-Meter	Hanna Instruments
Photometer	MAGV
Pipettierhelfer PIPETBOY	Integra Biosciences, VWR

Röntgenfilm-Entwickler Optimax	Protec
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific, Holten
Spannungsquellen	Biometra, Bio-Rad, Pharmacia
Thermocycler	Applied Biosystems, Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot Semi-Dry-Blot-System	Bio-Rad
Ultraschallbad Sonorex RK 52	Bondelin
UV-Transluminator 312 nm	Bachofer
Vakuumpumpe Saskia	Ilmvac Labortechnik
Wasserbäder	Memmert
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld
Zellkulturinkubator	Labotect

### 2.1.13 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Abschnitt 2.1.13.1 enthält Oligonukleotide (Primer) für die Amplifikation von Sequenzen zur Erstellung von Selektionsplasmiden. Primer zur Überprüfung der Positiv- bzw. Negativselektionen sowie zur Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung rekombinanter Vacciniaviren sind unter 2.1.13.2 und 2.1.13.3 aufgeführt. Oligonukleotide für die Überprüfung rekombinanter Viren mittels RT-PCR sowie für die 5'-RACE-PCR sind in 2.1.13.4 aufgelistet. Abschnitt 2.1.13.5 enthält Primer für die Amplifizierung der N-Protein-Nukleotidsequenz zur Generierung der BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zelllinie. Alle Sequenzangaben beziehen sich auf das Genom von PEDV MN (GenBank Akzessionsnummer KF468752) bzw. CV777 (GenBank Akzessionsnummer AF353511). Oligonukleotide, deren Bezeichnung auf ein „F“ endet, besitzen eine positive Polarität, solche die auf ein „R“ enden eine negative.

#### 2.1.13.1 Oligonukleotide für die Erstellung von Selektionsplasmiden

Primernamen	Nukleotidsequenz (5' → 3')
PEDV-MN-24300-XhoI-F	CTCGAGATTGAGAGTTGTGTGGTCACCTATG
PEDV-MN-24793-BsmBI-Sall-R	GTCGACCGTCTCACCATCACTGCACGTGGACC
PEDV-MN-25419-PstI-BamHI-	CTGCAGGGATCCCGTCTCAGTAACTGCATTTGACTCAA



BsmBI-F	
PEDV-MN-25920-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCAAAAAAGACCCAATTGACCT
GFP-BsmBI-BamHI-PstI-F	CTGCAGGGATCCCGTCTCTATGGTGAGCAAGGGC
GFP-BsmBI-R	CGTCTCGTTACTTGTACAGCTCGTCCA
PEDV-MN-20130-XhoI-F	CTCGAGTAAGATTAAGTTGTGATGGGGAG
PEDV-MN-20633-BsmBI-Sall-R	GTCGACCGTCTCTTGTTTACGTTGACCAAATG
PEDV-MN-24800-BamHI-BsmBI-F	CTGCAGGGATCCCGTCTCGATGTTTCTTGGACTTT
PEDV-MN-25300-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCAAGTCGATGCTACTAAC
CV777-20632-BsmBI-F	CGTCTCAAACAAATGAGGTCTTTAAT
CV777-22120-NotI-R	GCGGCCGCGCTGTTCTGACTCA
CV777-22080-F	TTACCCCATCTCTTCTAGAA
CV777-23930-NotI-R	GCGGCCGCGTTTGGGCAACAAAA
CV777-23890-NcoI-F	CCATGGACCGGCAGATTATCAGCACTTAATGCTTTTGT
CV777-24793-BsmBI-R	CGTCTCAACATCACTGCACGTGGACCTTTTCAAAGCT
vvR1-230nt-XhoI-F	CTCGAGACCACCATTTTCAGATAATGG
vvT7-BsmBI-PstI-R	CTGCAGCGTCTCACTATAGTGAGTCGTATT
PEDV-MN-293-BsmBI-BamHI-F	GGATCCCGTCTCTATGGCTAGCAACCATGTT
PEDV-MN-740-NotI-R	GCGGCCGCCAATGTTGAGTTGACCGTCT
QC-5'UTR-1-F	CTTTTTCTAGACCTTGTCTACTCAA
QC-5'UTR-1-R	TTGAGTAGACAAGGTCTAGAAAAAG
QC-5'UTR-2-F	CCGGCCGCATGTTTCATGCTGCTGGA
QC-5'UTR-2-R	TCCAGCAGCATGAACATGCGGCCGG
QC-5'UTR-3-F	TGCTGGAAGCTGGCGTGGAATTTCA
QC-5'UTR-3-R	TGAAATTCCACGCCAGCTTCCAGCA
QC-5'UTR-4-F	AACCAGTAACTGCCGGCTATGGCTA
QC-5'UTR-4-R	TAGCCATAGCCGGCAGTTACTGGTT
GFP-200-NcoI-XhoI-F	CCATGGCTCGAGACGGCGTGCAGTGCTTCA
PEDV-MN-25448-BsmBI-PstI-R	CTGCAGCGTCTCTACTCGTCTAGTTGAATTGAG
PEDV-MN-24746-BsmBI-F	CGTCTCAGTAATCCTAGACTTCAACCTTACGAAGTTTTT
GFP-500-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCTTGAAGTTCACCTTGATG

P-USA-24794-BsmBI-R	CGTCTCACCATCACTGCACGTGGACCTTTT
PEDV-MN-22080-F	GGTTTTTACCATATTTCTTCTAGAA
P-USA-23940-NotI-R	GCGGCCGCTGAGGGTTTGAGCAACAAAAGC
P-USA-20628-BsmBI-F	CGTCTCAAACAAATGAAGTCTTTAACCTAC
PEDV-MN-22130-NotI-R	GCGGCCGCAATTGGCTGTTCATGACTCAGA
QC-S-F226S-F	GAGGATGGTATTTCTTATCAACCCTGTACA
QC-S-F226S-R	TGTACAGGGTTGATAAGAAATACCATCCTC
QC-S-L375F-F	TATTATTGTTTTTTTAAAGTGGATACTTA
QC-S-L375F-R	TAAGTATCCACTTTAAAAAACAATAATA
QC-S-H486P-F	GATGGTTTTTACCCTATTTCTTCTAGAAA
QC-S-H486P-R	TTTCTAGAAGAAATAGGGTAAAAACCATC
PEDV-MN-24395-XhoI-NcoI-F	CTCGAGCCATGGGATTTTAGCTTCTCTGCCCA
PEDV-MN-24795-BsmBI-PstI-R	CTGCAGCGTCTCATCACTGCACGTGGACCTTT
PEDV-MN-24790-BsmBI-F	CGTCTCAGTGATGTTTCTTGGACTTTTTCAA
PEDV-MN-25037-BsmBI-R	CGTCTCAAAGAACAATGACAGCAAAACG
PEDV-MN-25087-BsmBI-F	CGTCTCTCTTTTTGTTGCACACTTATTGGCAG

#### 2.1.13.2 Oligonukleotide zur Überprüfung der Selektionen

Primernamen	Nukleotidsequenz (5' → 3')
VVR1-300-F	ACCCAATCGTTTAGAAAAGGAAGCCTCCTT
PEDV-MN-300-R	CTAGCCATAGCCGACAGTTACTGGT
PEDV-MN-27700-F	ATTAAACAATGTTTGACTGGCTTAT
VVL1+300-R	TTATAGAGCCCACGTTTAAACATTCTTTATT
PEDV-MN-2900-F	TTCTATTATGATGGAACACTATACT
Gpt-300-as	AGTGCGCTTTTGGATACATTTACAG
Gpt-250-s	GAAGGCGATGGCGAAGGCTTCATCG
PEDV-MN-24150-R	ATAAGCCAGCGATGGCAATAACATC
PEDV-MN-3700-R	AGATCCCAAGATAGCCTTTTGTGAC
PEDV-MN-23400-F	GGTCGCTCTGTGGCAGATCTAGTC
PEDV-MN-6300-F	AAAGTGTGCGCTATAATGCAAAG
PEDV-MN-7200-R	GTGTATTTGTTATCTGTTATGTCAAAGTTG
PEDV-MN-19800-F	TTGCAATCTCTACAACATATGGTGCTG
PEDV-MN-20700-R	CATCTTGTGGTAGGCTAAGTGTTGA

PEDV-MN-9800-F	GGTAGCGACTTAGATGGTGTATGT
PEDV-MN-10700-R	ACCAGTTGCCAGTCACACTAGC
PEDV-MN-16300-F	TGTTCTCATGCAGCGGTGATT
PEDV-MN-17200-R	TGCTACAGTCTTTAAAAAGACCACA
CV777-23890-NcoI-F	CCATGGACCGGCAGATTATCAGCACTTAATGCTTTTGT
PEDV-MN-27704-NotI-R	GCGGCCGCTTAATTTCTGTGTGCAAGATCTC
PEDV-MN-25087-BsmBI-F	CGTCTCTCTTTTGTGTCACACTTATTGGCAG
GFP-500-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCTTGAAGTTCACCTTGATG
GFP-BsmBI-BamHI-PstI-F	CTGCAGGGATCCCGTCTCTATGGTGAGCAAGGGC
PEDV-MN-25920-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCAAAAAAGACCCAATTGACCT
CV777-22120-NotI-R	GCGGCCGCGCTGTTCTGACTCA
PEDV-MN-21500-F	GATTTATGGACTAGGCCAAT
PEDV-MN-1122-NotI-R	GCGGCCGCGAAGCCACAAGGACTGGCTTAC
PEDV-MN-820-XhoI-R	CTCGAGCTTAATAGATGTTAAATTCTGACTCGCATA
PEDV-MN-26850-NotI-R	GCGGCCGCTGTTGTTGCCATTACCACGACT
PEDV-MN-25300-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCAAGTCGATGCTACTAAC
GFP-BsmBI-R	CGTCTCGTTACTTGTACAGCTCGTCCA
PEDV-MN-22700-R	GACATTCTTAAAGGCTAACAAGTGT
PEDV-MN-23600F	GGATGTTCTACAGCGGAACCAGCAA
PEDV-MN-25520-R	CAGGAAAAAGAGTACGAAAAGCCAA
GFP-XhoI-F	CTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
PEDV-MN-25037-BsmBI-R	CGTCTCAAAGAACAATGACAGCAAAACG
PEDV-MN-24790-BsmBI-F	CGTCTCAGTGATGTTTCTTGGACTTTTTCAA
PEDV-MN-24395-XhoI-NcoI-F	CTCGAGCCATGGGATTTTAGCTTCTCTGCCCA
PEDV-MN-22130-NotI-R	GCGGCCGCAATTGGCTGTTTCATGACTCAGA

### 2.1.13.3 Oligonukleotide zur Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung rekombinanter Vacciniaviren

Primernamen	Nukleotidsequenz (5' → 3')
vvR1-XhoI-F	CTCGAGGCGTCCATAGTCCCGTTCCGT
PEDV-MN-3700-R	AGATCCCAAGATAGCCTTTTGTGAC
PEDV-MN-2800-F	TGTACCACGCGTCATTGAACTTC
PEDV-MN-6000-R	TCTCCATCATGCACCATAACAGTG
PEDV-MN-5600-F	TACTGGCTTACTGGTGTGA

PEDV-MN-8600-R	CGTTCATCAACAATGTAAAG
PEDV-MN-8300-F	GGAAGTCTGTCTACTGTTA
PEDV-MN-11300-R	CGACATAAGTAGATGCAACA
PEDV-MN-11000-F	GAGCGGAATATTAAGATTTC
PEDV-MN-13363-PstI-R	CTGCAGCACCAAATATATCACTCTTAACAAA
PEDV-MN-12800-F	CCAAGTCTGCGATGGAACACGAGCA
PEDV-MN-16300-R	AAGCTGTAAACACTATACGTGCACC
PEDV-MN-15700-F	GCTACATCCGATTGGACTGA
PEDV-MN-17700-R	GTCTGATAGGTTGGCCAGGT
PEDV-MN-17400-F	CATGCGCAATGTTAGAGGTT
PEDV-MN-20700-R	CATCTTGTGGTAGGCTAAGTGTTGA
PEDV-MN-20130-XhoI-F	CTCGAGTAAGATTAAGTTGTGATGGGGAG
PEDV-MN-23100-R	CTCGAGTAAGATTAAGTTGTGATGGGGAG
PEDV-MN-22800-F	TCCACTTTTAACAGTACTAG
PEDV-MN-25920-NotI-NdeI-R	CATATGGCGGCCGCAAAAAAGACCCAATTGACCT
PEDV-MN-25087-BsmBI-F	CGTCTCTCTTTTTGTTGCACACTTATTGGCAG
PEDV-MN-27704-NotI-R	GCGGCCGCTTAATTTCTGTGTCTGAAGATCTC
PEDV-MN-27528-XhoI-F	CTCGAGAAGAAGGAAAAGAACAAGC
vvL1-R	CTTAACGATGTTCTTCGCAGATG
PEDV-MN-27700-F	ATTAAACAATGTTTGACTGGCTTAT
PEDV-MN-20633-BsmBI-Sall-R	GTCGACCGTCTCTTGTGTTACGTTGACCAAATG
QC-CV777-23684-R	TTGACTAATAGCCTCTTTAACACTCTC
CV777-22200F	TAGTAGTGCCAATCTCGTTG
GFP-BsmBI-BamHI-PstI-F	CTGCAGGGATCCCGTCTCTATGGTGAGCAAGGGC

#### 2.1.13.4 Oligonukleotide für die RT-PCR und 5'-RACE-PCR

Primernamen	Nukleotidsequenz (5' → 3')
PEDV-MN-28038-R	GTGTATCCATATCAACACCGTCAGG
PEDV-MN-1-F	ACTTAAAAAGATTTTCTATCTACGGATAGT
PEDV-MN-820-XhoI-R	CTCGAGCTTAATAGATGTTAAATTCTGACTCGCATA
PEDV-MN-20800-F	GTGAAAACCAGGGTGTCAAT
PEDV-MN-22130-NotI-R	GCGGCCGCAATTGGCTGTTTCATGACTCAGA
PEDV-MN-21500-F	GATTTATGGACTAGGCCAAT

CV777-20632-BsmBI-F	CGTCTCAAACAAATGAGGTCTTTAAT
CV777-22120-NotI-R	GCGGCCGCGCTGTTCGTGACTCA
PEDV-MN-24395-XhoI-NcoI-F	CTCGAGCCATGGGATTTTAGCTTCTCTGCCCA
PEDV-MN-25520-R	CAGGAAAAAGAGTACGAAAAGCCAA
GFP-XhoI-F	CTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
CV777-600-R	CTAACTCTTCGAGGAAGTAATTACA
5' RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
PEDV-MN-370-XhoI-R	CTCGAGTTCCTAGCAGTGCAAAAGCCAAAA
5' RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG

### 2.1.13.5 Oligonukleotide für die Amplifizierung der N<sub>MN</sub>-Sequenz

Primernamen	Nukleotidsequenz (5' → 3')
PEDV-MN-26379-BamHI-F	GGATCCATGGCTTCTGTCAGTTTTTCAGGATCGT
PEDV-MN-27704-Flag N- EcoRV-R	GATATCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCATTTCCT GTGTCAAGA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

#### 2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte im entsprechenden Medium (2.1.8.5) auf Zellkulturschalen von 10 und 15 cm Durchmesser in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % relativer Luftfeuchte. Zusätzlich wurden Multiwell-Zellkulturplatten mit 6, 12, oder 24 Vertiefungen eingesetzt. Nach der Bildung eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen umgesetzt, wobei zuerst das Kulturmedium entfernt wurde. Auf einen Waschschriff mit 3-5 ml 37 °C warmer Trypsin-EDTA-Lösung folgte eine fünf- bis zehnminütige Inkubation der Zellen mit 1-3 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von Kulturmedium vereinzelt und in geeigneten Verdünnungen passagiert (BHK-21, BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N und Vero 1:40, CV-1 1:3 und D980R 1:6).

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Für eine dauerhafte Vorhaltung der entsprechenden Zelllinien wurden Kryokonserven angelegt. Nach der Vereinzlung der Zellen, wie oben (2.2.1.1) beschrieben, wurden diese durch Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 Minuten pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde erfolgte die Resuspension der Zellen in FKS mit 10 % DMSO und die Aliquotierung in

Kryoröhrchen. Die Zellen wurden zunächst in einem Kryo-Einfriergerät bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag zur längerfristigen Lagerung in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl lebender Zellen erfolgte nach der Vereinzelung der Zellen in einer Neubauer-improved-Zählkammer. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung verdünnt (1:5) und nach gründlichem Mischen in beide Zälfelder eingefüllt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Mittelwert der Zellzählung von 8 Großquadraten herangezogen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}}$$

Im Falle der Neubauer-improved-Zählkammer beträgt die ausgezählte Fläche 1 mm<sup>2</sup> und die Kammertiefe 0,1 mm.

### 2.2.1.4 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen mit PEDV wurden der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Zellen mit einer definierten Menge Virussuspension unter Zusatz von Trypsin (80 µg/ml) im Brutschrank. Daraufhin wurde das Inokulum entfernt, die Zellen erneut mit Medium gewaschen und mit serumhaltigem Medium versorgt. Nach 48 h wurde das alte Medium nach einem erneuten Waschschrift durch serumfreies trypsinhaltiges Medium (25 µg/ml) ersetzt. Die Ernte erfolgte je nach Ausmaß des zytopathischen Effektes nach 72-96 h. Für Experimente bei denen ein bestimmtes Verhältnis von Viruspartikeln zu Zielzellen (MOI: multiplicity of infection) erforderlich war, wurde das benötigte Volumen der Virussuspension mit folgender Formel bestimmt:

$$MOI = \frac{\text{Virussuspension (ml)} \times \text{Virustiter} \left(\frac{PFU}{ml}\right)}{\text{Zellzahl}}$$

### 2.2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1.5.1 Chemische Transfektion

Die Transfektion von DNA in Säugerzellen wurde in einer 6-Well-Platte bei ca. 90%iger Zellkonfluenz durchgeführt. Dazu wurden am Vortag etwa 5 x 10<sup>5</sup> CV-1 bzw. 6 x 10<sup>5</sup> BHK-Zellen pro Vertiefung ausgesät. Für die Transfektion wurden zunächst 10 µl Lipofectamine 2000 in ein Polystyren-Röhrchen mit 250 µl Opti MEM- Medium vorgelegt. Während einer

fünfminütigen Inkubationsphase wurden in ein Reaktionsgefäß 4 µg des zu transfizierenden Plasmids in 250 µl Opti-MEM I eingefüllt und anschließend zusammen mit dem Lipofectamine-Ansatz für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen abgenommen, diese einmal mit Opti-MEM I gewaschen und anschließend der Transfektionskomplex hinzugefügt. Nach einer fünf- bis sechsstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und durch entsprechendes Zellkulturmedium (2.1.8.5) ersetzt. Die darauffolgende Inkubation der Zellen im Brutschrank betrug 48-72 Stunden.

#### **2.2.1.5.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation)**

Für die Herstellung rekombinanter PEDVs wurden genomlange *in-vitro*-transkribierte recPEDV-RNAs in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen (2.2.1.6) elektroporiert. Dazu wurde eine 10 cm-Schale mit etwa 95%iger Zellkonfluenz 24 h vor der Transfektion mit 5 µg/ml Doxycyclin induziert. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Zellen abgelöst (2.2.1.1) und bei 1200 rpm für 4 Minuten pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 600 µl eiskaltem PBS aufgenommen und zusammen mit 10-20 µg *in-vitro*-transkribierter RNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde in einem Gene Pulser II (Bio-Rad) mit zwei Pulsen bei 1,5 kV Spannung, 25 µF Kapazität und 200 Ohm Widerstand durchgeführt. Nach Überführung der elektroporierten Zellen auf eine 10 cm-Zellkulturschale wurden diese mit 10 ml FKS-haltigem Medium versetzt und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschrift durch 8 ml Medium ohne FKS mit Zusatz von Trypsin (15 µg/ml) ersetzt. 48 h nach der Elektroporation wurden Überstand und Zellen geerntet und durch Zentrifugation (2500 rpm, 5 min, 4 °C) voneinander getrennt. Daraufhin wurden die Zellen in 500 µl FKS-freiem Medium resuspendiert und dreimal im Ultraschallbad aufgetaut und in flüssigem Stickstoff gefroren um weitere Viruspartikel aus den Zellen freizusetzen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand des Zellpellets dem vorher bereits gereinigten Überstand zugesetzt und in Aliquots à 1 ml bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.1.6 Generierung einer Zelllinie, die das N-Protein von PEDV MN induzierbar exprimiert**

Für die Herstellung einer für den *Rescue* von rekombinanten PEDVs benötigten BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zelllinie wurden BHK-Tet/ON-Zellen (Norbert Tautz, Universität Lübeck) mit dem Plasmid pTREhyg-PEDV-N-flag transfiziert (2.2.1.5.1). Dieses wurde durch Amplifizierung (2.2.3.1.1) der N-Sequenz von PEDV MN mit C-terminalem FLAG-Tag und anschließende Klonierung (2.2.3.1.6) mit *Bam*HI und *Eco*RV in den Vektor pTREhyg erzeugt. Es enthält

eine Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion der transfizierten Zellen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und in Verdünnungen von 1:400, 1:350 und 1:250 auf 10 cm-Zellkulturschalen umgesetzt. Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte durch Zusatz von Hygromycin in einer Konzentration, welche Zellen ohne Resistenzkassette zuverlässig abtötet (600 µg/ml), zum Kulturmedium. Nach einer Inkubationsdauer von 9 Tagen, während der das Selektivmedium alle zwei Tage gewechselt wurde, konnten 12 einzelne Zellkolonien mit einer Pipettenspitze abgelöst und auf 6-Well-Platten überführt werden. Ein konfluentes Monolayer wurde nach 6 Tagen Inkubation im Selektivmedium erreicht, woraufhin die Zellen abtrypsiniert und pro Zellklon auf je eine Vertiefung einer 6-Well-Platte für die Generierung einer Zellstocks sowie je zwei Vertiefungen einer 12-Well-Platte ausgesät wurden. Von diesen wurde nach Erreichen der Konfluenz je eine Vertiefung mit 5 µg/ml Doxycyclin induziert. Nach 20 h wurden je eine induzierte und eine nicht induzierte 12-Well-Vertiefung mit 200 µl RIPA-Puffer lysiert und mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Western Blot analysiert. Die Proteinexpression konnte mit Hilfe eines ANTI-FLAG® M2-Antikörpers detektiert werden. Von geeigneten Zellklonen wurden Kryokulturen angelegt.

#### **2.2.1.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot zur Erfolgskontrolle nach Erstellung einer BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zelllinie**

Um den Selektionserfolg bei der Erstellung einer BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zelllinie (2.2.1.6) zu kontrollieren, wurde das in diesen Zellen nach Induktion mit Doxycyclin exprimierte N<sub>PEDV MN</sub>-Protein im Western Blot nachgewiesen. Auf die Lyse der zu analysierenden Zellen folgte eine SDS-PAGE (Laemmli 1970) in einem TRIS-Tricin-Puffersystem. Das zweiphasige Gel setzte sich wie folgt zusammen:

	4%iges Sammelgel	10%iges Trenngel
Aqua dd.	12,9 ml	9 ml
Jagow Gelpuffer	12 ml	3,5 ml
40%ige Acrylamidlösung	9 ml	1,4 ml
Glycerin	2 ml	-
APS	175 µl	116 µl
TEMED	15 µl	12 µl

Nach Zugabe von SDS-Auftragepuffer und β-Mercaptoethanol (5 % des Gesamtvolumens) wurden die Zelllysate für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Geltaschen eingefüllt. Ein Proteinmarker diente der Kontrolle der Proteingröße. Die Proben wurden bei 60 V im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 120 V aufgetrennt.



Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Trenngel in einem Semi-Dry-Blot-System (BioRad) bei 10 V innerhalb von 40 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in PBST mit 5 % Milchpulver geschüttelt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu minimieren. Auf drei Waschschrte mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper. Da das nachzuweisende Protein einen C-terminalen FLAG-tag besitzt, wurde ein gegen diesen gerichteter monoklonaler Antikörper (ANTI-FLAG® M2, 2.1.5.1) in einer Verdünnung von 1:100000 in PBST verwendet. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine vierzigminütige Inkubation mit dem polyklonalen Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG-PO (Dianova) in einer Verdünnung von 1:20000. Die Proteinbanden konnten nach Waschen mit PBS und Inkubation mit Western Lightning Plus-ECL Substrat (PerkinElmer) auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

#### **2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz**

Für die Darstellung infizierter Zellen, insbesondere zum Zweck der Titerbestimmung (2.2.5.1.1), wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dafür wurden Vero-Zellen in 24-Well-Platten 48–72 Stunden nach Infektion mit 500 µl 4%iger Paraformaldehydlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit je 500 µl PBSAT gewaschen. Die Pufferlösung enthielt dabei bovines Serumalbumin sowie Triton-X-100, um unspezifische Reaktionen zu minimieren bzw. die Zellmembran zu permeabilisieren. Die gleiche Lösung wurde zur Herstellung der Antikörperverdünnungen verwendet, von welchen je 250 µl auf eine Vertiefung aufgetragen wurden. Als Primärantikörper wurde zu diesem Zweck ein monoklonaler, gegen das N-Protein von PEDV gerichteter Antikörper (anti-PEDV-N, Mathias Ackermann, Zürich, 2.1.5.1) in einer Verdünnung von 1:200 oder ein gegen das S-Protein von PEDV gerichteter Antikörper (anti-PEDV-S), Verdünnung 1:400, verwendet. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit PBSAT gewaschen und anschließend mit 250 µl Sekundärantikörperlösung (Ziege anti-Maus IgG-cy™3, 1:500) für 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Vertiefungen erneut dreimal gewaschen wurden, konnten rot fluoreszierende Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiovert 35) detektiert werden.

#### **2.2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen**

##### **2.2.2.1 Anzucht von Bakterien**

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden *E. coli* HB101 K-12 auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Anschließend wurden einzelne

Kolonien in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft, über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert und zur Plasmidpräparation verwendet.

#### **2.2.2.2. Herstellung kompetenter *E. coli* HB101 K-12**

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen wurde die Methode nach Hanahan angewandt. Nach Anzucht von *E. coli* HB101 K-12 auf einer LB-Agarplatte wurde am nächsten Tag eine Kolonie in 4 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden 2,5 ml der Übernachtskultur in 250 ml LB<sup>++</sup>-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,4-0,55 geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Bakteriensuspension bei 5000 rpm, 4 °C für 5 Minuten wurde das Bakterienpellet in 100 ml TFB1 resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit Resuspension des Pellets in 10 ml TFBII und erneuter Inkubation auf Eis für 15-60 Minuten. Nach Aufteilung der Bakteriensuspension in Aliquots à 100 µl wurden diese bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.3 Transformation**

Die Transformation kompetenter *E. coli* HB101 K-12 erfolgte mit Plasmiden, die eine Ampicillinresistenz vermitteln. Dazu wurden 50 µl Bakteriensuspension (2.2.2.2) zur Plasmid-DNA gegeben und 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock für 60 Sekunden bei 42 °C sowie eine erneute Inkubation auf Eis für 2-5 Minuten. Anschließend wurden dem Transformationsansatz 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 60-90 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Nach Pelletierung der Bakterien bei 3000 rpm, 4 °C für 3 Minuten wurden diese in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.3 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.3.1 Standardmethoden**

##### **2.2.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde standardmäßig folgender Reaktionsansatz verwendet:

X µl	Probe (DNA)
0,5 µl	Vorwärtsprimer (25 µM)
0,5 µl	Reversprimer (25 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix (10 µM)
5,0 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10X)

0,5 µl        *Taq*-Polymerase  
ad 50 µl      Aqua dd.

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten von Plasmiden wurden 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt, bei Einsatz von Vacciniavirus-DNA als Probe wurden standardmäßig 1,5 µl DNA verwendet.

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	50-60 °C	30 s	35 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	7 min	

Anschließend folgte eine Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese und falls erforderlich eine Aufreinigung der Fragmente über Mini-Spinsäulen mit dem GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) sowie Sequenzierung.

#### 2.2.3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Eine Mutagenese-PCR wurde eingesetzt wenn die Änderung oder Deletion einzelner Nukleotide innerhalb einer Plasmid-DNA erforderlich war. Die dafür verwendeten komplementären Primerpaare wurden so gewählt, dass das zu ändernde Nukleotid in der Mitte der 24-28 nukleotidlangen Sequenz liegt. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

X µl        Probe (DNA, ca. 200 ng)  
0,7 µl      Vorwärtsprimer (25 µM)  
0,7 µl      Reversprimer (25 µM)  
1,0 µl      dNTP-Mix (10 µM)  
10,0 µl     5X Phusion HF Puffer  
0,5 µl      Phusion-DNA-Polymerase  
ad 50 µl     Aqua dd.

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	50-60 °C	30 s	30 Zyklen
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Nach Analyse des PCR-Produktes mittels Agarosegelelektrophorese wurden 10 µl des Produkts einem vierstündigen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* unterzogen. Dies war erforderlich, um die ursprüngliche, methylierte Plasmid-DNA zu zerstören, da *DpnI* nur methylierte DNA erkennt und schneidet, nicht jedoch das PCR-Produkt. Anschließend erfolgte die Transformation des PCR-Produkts in kompetente Bakterienzellen (2.2.2.3) mit darauffolgender Plasmid-DNA-Präparation und Sequenzierung.

#### 2.2.3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte DNA-Sequenzen und schneiden diese nach einem spezifischen Muster. Da dabei häufig spezifische Basenüberhänge entstehen, welche die gezielte Zusammenführung bestimmter DNA-Sequenzen ermöglichen, wurden Restriktionsenzyme zur Konstruktion neuer DNA-Moleküle mittels Klonierung verwendet. Desweiteren dienten Restriktionsendonukleasen der Kontrolle neu generierter Plasmide im Restriktionsverdau. Das Enzym *NotI* wurde zur Vorbereitung rekombinanter Vacciniavirus-DNA für die *In-vitro*-Transkription eingesetzt. Für den Restriktionsverdau zur Klonierung wurden hierbei 2,5 µg DNA, für die Analyse von Plasmiden 200 ng DNA in Gegenwart des empfohlenen Puffers sowie Aqua dd. den Herstellerangaben entsprechend verdaut.

#### 2.2.3.1.4 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung einer Religation geschnittener Vektoren in Ligationsansätzen wurde die linearisierte Plasmid-DNA mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde die Vektor-DNA nach dem Restriktionsverdau unter Zugabe von 1 U des Enzyms weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.3.1.5 Ligation

Die Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mit dem pGEM-T Vector System Kit von Promega. Hierbei macht man sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, am Ende der PCR-Produkte A-Überhänge einzufügen, zunutze, da diese direkt kompatibel zu den entsprechenden T-Überhängen des linearisierten T-Vektors sind.

Gerichtete Klonierungen mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme wurden in einem Gesamtansatz von 10 µl über Nacht bei 4 °C ligiert. Der Ligationsansatz enthielt hierbei Vektor und Insert (je 50 ng – 3 µg) in einem spezifischen Verhältnis, 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10X) und Aqua dd. ad 10 µl.

#### **2.2.3.1.6 Klonierung**

Für die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden Vektor und Insert mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (2.2.3.1.3) und der Vektor anschließend dephosphoryliert (2.2.3.1.4). Die erforderlichen Restriktionsschnittstellen wurden zuvor mit Hilfe entsprechender Primer in einer PCR (2.2.3.1.1, für Primer siehe 2.1.13.1) eingebaut, falls diese nicht in der Sequenz vorhanden waren. Nach Auftrennung der Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Banden auf einem UV-Illuminator dargestellt, ausgeschnitten und mit dem GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden Vektor- und Insert-DNA ligiert (2.2.3.1.5) und in kompetente Bakterienzellen transformiert (2.2.2.3). Die mittels DNA-Präparation hergestellte Plasmid-DNA wurde anschließend im Restriktionsverdau überprüft.

#### **2.2.3.2 Isolierung von DNA**

##### **2.2.3.2.1 Plasmid-DNA-Präparation aus prokaryotischen Zellen**

###### **2.2.3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen zu analytischen Zwecken wurde das GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

###### **2.2.3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen im präparativen Maßstab wurde mit dem Qiaprep Plasmid Maxiprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### **2.2.3.2.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen**

###### **2.2.3.2.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im analytischen Maßstab**

Zur Analyse der genomischen DNA rekombinanter Vacciniaviren wurden CV-1-Zellen auf den Vertiefungen einer 6-Well-Platte mit dem entsprechenden Virus infiziert und nach vollständiger Infektion geerntet. Dazu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze abgelöst, mit dem Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl Aqua dd. resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Proteinase-K-Puffer (2X) sowie 4 µl Proteinase K

für 2 Stunden bei 55 °C inkubiert. Darauf folgte eine Reinigung der DNA wie in Kapitel 2.2.3.3.1 beschrieben.

#### **2.2.3.2.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im präparativen Maßstab**

Diese Methode wurde zur Generierung von größeren Mengen genomischer DNA rekombinanter Vacciniaviren für die *In-vitro*-Transkription angewandt. Dazu wurden acht 15 cm-Zellkulturschalen BHK-21-Zellen mit dem betreffenden Vacciniavirus infiziert und drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Infektion des Monolayers wurde das Medium entfernt, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst sowie gepoolt und bei 3000 rpm, 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4,5 ml Puffer A resuspendiert. Nach Verteilung der Zellsuspension auf 5 MagNA Lyser Green Bead Röhrchen wurde diese im MagNA Lyser Instrument (Roche) für 20 Sekunden homogenisiert (speed 5000) und anschließend abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde je Röhrchen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Überstände gepoolt und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 25 ml 36%iger-Saccharoselösung gefüllt. Die Pelletierung der Viruspartikel durch das Saccharosekissen fand anschließend in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm, 4 °C für 80 Minuten statt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 900 µl Puffer A resuspendiert. Nach Verteilung der Virussuspension auf 5 Reaktionsgefäße wurde diese mit je 20 µl DNase-Puffer (10X) und 2 µl DNase versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte im nächsten Schritt durch Inkubation mit je 10 µl EDTA-Lösung (0,5 M) bei 65 °C für 20 Minuten. Anschließend folgte nach Zugabe von 200 µl Proteinase-K-Puffer (2X) sowie 4 µl Proteinase K ein weiterer Inkubationsschritt von 2 Stunden bei 55 °C. Daraufhin wurde die DNA aufgereinigt (2.2.3.3.1).

### **2.2.3.3 Reinigung von DNA**

#### **2.2.3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation**

Um Vacciniavirus-DNA aufzureinigen, wurde diese im Verhältnis 1:1 mit Phenol gemischt und zunächst bei 13000 rpm für 4 Minuten abzentrifugiert. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze wurde die obere wässrige Phase, welche nach Zentrifugation die DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform versetzt. Auf einen weiteren Zentrifugationsschritt folgte eine erneute Überführung der oberen Phase in ein Reaktionsgefäß. Daraufhin wurde die DNA durch Zugabe von reinem Ethanol im Verhältnis 1:2,5 präzipitiert und bei 13000 rpm für 8 Minuten pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet durch Zugabe von 70%igem Ethanol und anschließendem

Abzentrifugieren (13000 rpm, 4 min) zweimal gewaschen und in 50 µl (für analytischen Maßstab) bzw. 24 µl (für präparativen Maßstab) Aqua dd. aufgenommen.

#### **2.2.3.4 DNA-Analyse**

##### **2.2.3.4.1 Agarosegelelektrophorese**

Für die Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA wurde eine Elektrophorese mit Agarosegelen bestehend aus TAE-Puffer und 1 % Agarose durchgeführt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer unter Zusatz von Ethidiumbromid. Nach Zugabe von Auftragepuffer (5X) wurden die Proben in die Geltaschen eingefüllt und für 30 Minuten bei 120 V und 400 mA im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht dargestellt und dokumentiert. Ein parallel aufgetragener Größenmarker (2.1.9.2) diente der Abschätzung der Bandengröße.

##### **2.2.3.4.2 Sanger-Sequenzierung**

Die Bestimmung der Sequenz eines Plasmids oder PCR-Produktes erfolgte durch die Firma SeqLab, Göttingen. Für den Versand wurden 720-1200 ng Plasmid-DNA bzw. 18 ng DNA/100 bp bei PCR-Produkten mit 30 pmol des erforderlichen Primers und Aqua dd. in einem Gesamtvolumen von 15 µl vorbereitet.

##### **2.2.3.4.3 Bioinformatische Datenauswertung**

Die Analyse von Sequenzierungsergebnissen sowie die Erstellung von DNA- und Proteinalignments wurden mit dem Programm „BioEdit“ (Version 7.0.4) und der Software „SnapGene“ (GSL Biotech) durchgeführt. Letztere diente ebenfalls der Erstellung von Plasmid- und Viruskarten und dem Annotieren von Genen.

#### **2.2.4 Arbeiten mit RNA**

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter besonderer Sorgfalt durchgeführt, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Dazu zählte das ausschließliche Arbeiten mit Handschuhen, die Reinigung aller Geräte und Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol vor Arbeitsbeginn, sowie die Verwendung separater, nur für die Arbeit mit RNA bestimmter Materialien und Stocklösungen.

##### **2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen**

Für die Isolierung rekombinanter Coronavirus-RNA aus den Kulturüberständen physikalisch transfizierter Zellen (2.2.1.5.2) wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

#### 2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus infizierten Zellen wurde mit dem Total RNA Kit, peqGOLD (Peqlab) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.4.3 Reverse-Transkriptase-PCR

Die nach Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2 isolierte RNA diente als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription mit nachfolgender PCR zur Charakterisierung porciner Coronaviren.

Im ersten Schritt wurde dabei unter Verwendung des Expand Reverse Transcriptase Kits (Roche) die Virus-RNA nach folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

X µl	Probe (RNA, ca. 1 µg)		
0,5 µl	Reversprimer (25 µM)		
ad 10,5 µl	Aqua dd.		
10,5 µl	Gesamtvolumen	<b>Denaturierung</b>	10 min, 65 °C anschließend auf Eis
4,0 µl	5X Expand RT Puffer		
2,0 µl	DTT (100 mM)		
2,0 µl	dNTP-Mix (10 µM)		
1,0 µl	RNase-Inhibitor		
1,0 µl	Expand Reverse Transcriptase		
20,0 µl	Gesamtvolumen	<b>Reverse Transkription</b>	60 min, 43 °C anschließend auf Eis

Im Anschluss wurde mit 2,5 µl der komplementären DNA eine PCR nach dem in Kapitel 2.2.3.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Proben wurden daraufhin auf ein Agarosegel aufgetragen, die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und nach Aufreinigung mit dem GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) zur Sequenzierung verwendet.

#### 2.2.4.4 *In-vitro*-Transkription (IVT)

Die zur Elektroporation von BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen (2.2.1.5.2) benötigte genomlange rekombinante PEDV-RNA wurde mit dem RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7-Kit (Promega) nach folgendem Protokoll hergestellt:



10,0 µl	Transkriptionspuffer (5X)
5,0 µl	Cap-Analog (m7G(5')ppp(5')G, 30 mM)
je 3,75 µl	rATP, rCTP, rUTP (100 mM)
0,7 µl	rGTP
1,0 µl	RNase-Inhibitor
5,0 µl	T7-RNA-Polymerase Mix
20,0 µl	rekombinante Vacciniavirus-DNA nach <i>NotI</i> -Verdau
<hr/>	
52,95 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl RNase-freier-DNase folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten, um die rekombinante Vacciniavirus-DNA zu entfernen. Die Präzipitation der RNA erfolgte nach Mischen des Ansatzes mit 28 µl LiCl-Lösung (7,5 M) bei -20 °C für 30 Minuten. Anschließend wurde der Überstand durch Abzentrifugieren bei 13000 rpm, 4 °C für 25 Minuten entfernt und das RNA-Pellet zweimal mit je 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (13000 rpm, 4 °C, 4 min). Daraufhin wurde die RNA in 26 µl RNA Storage Solution resuspendiert. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden 2 µl RNA zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen (2.2.4.5).

#### **2.2.4.5 Agarosegelelektrophorese von RNA**

Für die qualitative Analyse *in-vitro*-transkribierter RNA wurden 1,2%ige Agarosegele aus MOPS-Puffer, Agarose und 3 % Formaldehyd verwendet. Nach Denaturierung von 2 µl RNA in RNA-Auftragepuffer (NEB) bei 65 °C für 10 Minuten und Zugabe von 1 µl 0,1%iger Ethidiumbromidlösung wurden die Proben in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese fand in MOPS-Puffer bei 80 V, 400 mA für 1 Stunde statt. Anschließend wurden die RNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht detektiert und dokumentiert.

#### **2.2.4.6 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

Diese Methode wurde zur Bestimmung der exakten Sequenz des 5'-Endes von PEDV-RNAs angewandt. Dazu wurde virale RNA aus infizierten Zellen präpariert (2.2.4.2) und das 5'-Ende des Genoms mit Hilfe des FirstChoice® RLM-RACE Kits (Ambion) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Nach Ligation in den pGEM-T Vektor (Promega, 2.2.3.1.5) und Transformation (2.2.2.3) erfolgte

zur Analyse des 5'-Genomendes eine Plasmid-DNA-Präparation (2.2.3.2.1.1) mit anschließender Sequenzierung (2.2.3.4.2).

## **2.2.5 Arbeiten mit Viren**

### **2.2.5.1 Porzine Coronaviren**

#### **2.2.5.1.1 Titerbestimmung**

Die Titration von PEDV-Suspensionen wurde auf 24-Well-Platten ausgeführt. Hierfür wurden Vero-Zellen am Vortag abtrypsiniert und so ausgesät, dass sie am nächsten Tag konfluent waren. Von der Virussuspension wurde in Duplikaten eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  in serumfreiem Medium angelegt. Nach Waschen der Zellen mit 0,5 ml serumfreiem Medium wurden diese mit je 200 µl der entsprechenden Virusverdünnung sowie Trypsin (80 µg/ml) für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Eine Vertiefung diente dabei als Negativkontrolle und enthielt Medium ohne FKS mit Zusatz von Trypsin. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit serumhaltigem Medium mit 1 % Carboxymethylcellulose abgedeckt. Nach einer Inkubationsdauer von 48–72 Stunden wurden die Plaques im Falle von GFP-exprimierenden rekombinanten Viren direkt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, in allen anderen Fällen mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert (2.2.1.7). Der Titer der Viruslösung in PFU (plaque forming units)/ml wurde nach Auszählung der Plaques mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\frac{PFU}{ml} = \frac{\text{Anzahl Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{eingesetztes Volumen (ml)}}$$

#### **2.2.5.1.2 Wachstumskurven**

Zur Erstellung einer Wachstumskinetik von PEDVs wurden Vero-Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde pro Erntezeitpunkt eine konfluente Vertiefung mit dem entsprechenden Virus in einer MOI von 0,01 infiziert. Dazu wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit der entsprechenden Virusmenge in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit Zusatz von Trypsin (80 µg/ml) im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das Inokulum entfernt, die Zellen einmal mit Medium ohne FKS gewaschen und anschließend mit serumfreiem trypsinhaltigem (12,5 µg/ml) Medium im Brutschrank inkubiert. Nach 6, 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden wurde der Überstand je einer Vertiefung geerntet und bei -80 °C gelagert. Es wurden mehrere biologische Replikate generiert, welche anschließend zur Titerbestimmung genutzt wurden (2.2.5.1.1) um einen repräsentativen Wachstumsverlauf darzustellen.

## 2.2.5.2 Vacciniaviren

### 2.2.5.2.1 Generierung rekombinanter Vacciniaviren

Für die Herstellung rekombinanter Vacciniaviren wurde das Prinzip der doppelten homologen Rekombination genutzt. Hierbei wurden CV-1-Zellen bei 90%iger Konfluenz mit einem Ausgangs-Vacciniavirus infiziert und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Donorplasmid transfiziert (2.2.1.5.1), welches zwischen homologen Bereichen zum Ausgangs-Vacciniavirus einen zu ändernden Genabschnitt enthält. Während der Replikation der Viren kann dieser Abschnitt unter Verlust des ursprünglich zwischen den homologen Bereichen gelegenen Abschnitts in das Vacciniavirusgenom integriert werden. Nach 2–3 Tagen wurden die Zellen geerntet, pelletiert (3000 rpm, 5 min, 4 °C) und in 700 µl Medium aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Selektion neu entstandener rekombinanter Viren mit Hilfe des *gpt*-Gens (Guanin-Phosphoribosyltransferase) von *E. coli* (Coley et al. 2005, Hertzog et al. 2004, Tekes et al. 2010, Tekes et al. 2008, Tekes et al. 2012) als Positiv- und Negativselektionsmarker.

#### 2.2.5.2.2 Positivselektion

Für die Positivselektion wurden CV-1-Zellen mit einem Ausgangs-Vacciniavirus infiziert. Das zu transfizierende Plasmid enthielt „*upstream*“ und „*downstream*“ des *gpt*-Gens homologe Bereiche zum Ausgangs-Vacciniavirus. Nach erfolgreicher Integration des *gpt*-Gens in das Vaccinavirusgenom wurden rekombinante Viren nach folgendem Protokoll selektiert: Das Medium auf am Vortag auf 6-Well-Platten ausgesäten CV-1-Zellen wurde durch Selektivmedium mit 250 µg/ml Xanthin, 25 µg/ml Mycophenolsäure und 15 µg/ml Hypoxanthin ersetzt. Nach 5–6 Stunden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der nach Infektion und Transfektion (2.2.5.2.1) geernteten Virussuspension infiziert. Diese wurde zuvor zur Vereinzelung der Viruspartikel dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und im Ultraschallbad getaut. Nach 2–3 Tagen wurden Virusplaques im Zellrasen unter dem Lichtmikroskop markiert, mit einer Pipettenspitze abgelöst und in 120 µl Medium aufgenommen. Das Plaquematerial diente als Inokulum für die nächste der insgesamt 3–4 Selektionsrunden.

#### 2.2.5.2.3 Negativselektion

Für die Negativselektion wurden CV-1-Zellen mit einem das *gpt*-Gen enthaltenden Ausgangs-Vacciniavirus infiziert. Nach Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid wurde das *gpt*-Gen durch den neu einzuführenden oder zu verändernden Genabschnitt ersetzt. Solche „*gpt*-negativen Endklone“ wurden anschließend auf D980R-Zellen selektiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium bei 30-40%iger Zellkonfluenz 5–6 Stunden vor Infektion durch

Selektivmedium mit 1 µg/ml 6-Thioguanin ersetzt. Daraufhin folgte die Infektion mit dem nach Infektion und Transfektion (2.2.5.2.1) erzeugten Virus sowie das Ernten der Plaques analog zur Positivselektion (2.2.5.2.2). Von den so erzeugten Endklonen wurde anschließend Vacciniavirus-DNA präpariert (2.2.3.2.2.1) und der Selektionserfolg mittels PCR überprüft (2.2.3.1.1). Wurde dieser nachgewiesen, wurden die entsprechenden Viruskclone einer weiteren Aufreinigung durch 3 Runden Plaquareinigung auf CV-1-Zellen ohne Selektivmedium unterzogen. Für die Infektion der ersten Runde wurden dabei 7 µl des Plaquematerials der letzten Negativselektionsrunde verwendet. Nach 2 Tagen wurden 3 Plaques pro Klon geerntet und weiter vereinzelt. Auf die letzte Runde folgte erneut eine Hochzucht im 6-Well-Format auf CV-1-Zellen mit anschließender DNA-Präparation. Eine Amplifikation des gesamten Endklongenoms in zwölf überlappenden PCR-Fragmenten (Abb. 12) diente zur Kontrolle der Vollständigkeit der PEDV cDNA. War diese erwiesen, wurden BHK-21-Zellen auf einer 15 cm-Zellkulturschale mit dem Endklon infiziert. Die geernteten Zellen dienten als Stocklösung für die Infektion von Zellen für die DNA-Isolierung im präparativen Maßstab (2.2.3.2.2.1) mit darauffolgender *In-vitro*-Transkription (2.2.4.4).

Fragment	Primer F	Primer R	Größe (kb)
1	VVL1-XhoI-F	PEDV-MN-3700-R	3,9
2	PEDV-MN-2800-F	PEDV-MN-6000-R	3,2
3	PEDV-MN-5600-F	PEDV-MN-8600-R	3
4	PEDV-MN-8300-R	PEDV-MN-11300-R	3
5	PEDV-MN-11000-F	PEDV-MN-13363-PstI-R	2,3
6	PEDV-MN-12800-F	PEDV-MN-16300-R	3,5
7	PEDV-MN-15700-F	PEDV-MN-17700-R	2
8	PEDV-MN-17400-F	PEDV-MN-20700-R	3,3
9	PEDV-MN-20130-XhoI-F	PEDV-MN-23100-R	3
10	PEDV-MN-22800-F	PEDV-MN-25920-NotI-NdeI-R	3,1
11	PEDV-MN-25087-BsmBI-F	PEDV-MN-27704-NotI-R	2,7
12	PEDV-MN-27528-XhoI-F	VVL1-R	1,2

**Abb. 12: Vollständigkeitskontrolle von vrecPEDV-MN (3.1.1.2, Abb. 15).** Die zur Amplifizierung der gesamten PEDV cDNA in vrecPEDV-MN verwendeten Primer und Größen der entsprechenden PCR-Produkte (1-12) sind dargestellt.

### 2.2.5.3 Genereller Ablauf zur Herstellung rekombinanter Coronaviren („Rescue“)

Für die Herstellung rekombinanter Coronaviren wurde wie in Kapitel 2.2.5.2.3 beschrieben Vaccinavirus-DNA im präparativen Maßstab (2.2.3.2.2.1) isoliert. Daraufhin wurde diese direkt *downstream* des Poly-A-Schwanzes in einem vierstündigen Restriktionsverdau mit *NotI* (2.2.3.1.3) zur Generierung eines definierten Endpunktes gespalten. Dieses Material diente als Vorlage für die *In-vitro*-Transkription (2.2.4.4), welche am T7-Promotor *upstream* der PEDV cDNA initiiert wird. Nach Elektroporation der so entstandenen rekombinanten PEDV-RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen (2.2.1.5.2) startet der coronavirale Replikationszyklus, welcher durch die Expressierung des N-Proteins gefördert wird. Die dabei in den Zellkulturüberstand freigesetzten rekombinanten PEDVs wurden anschließend geerntet und näher charakterisiert.

## 2.2.6 Herstellung im Rahmen dieser Arbeit verwendeter vrecPEDVs und recPEDVs

### 2.2.6.1 Verwendete Plasmide, Ausgangs-Vacciniaviren, entstandene Vacciniaviren und daraus resultierende recPEDVs

Tab. 2 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit generierten rekombinanten Vacciniaviren mit zugehörigem Ausgangs-Vaccinavirus und Selektionsplasmid sowie die entstandenen rekombinanten PEDVs. Der genaue Ablauf zur Herstellung einzelner rekombinanter Viren ist in Kapitel 3 beschrieben.

Ausgangs-Vacciniaviren	Selektions-plasmid	resultierende vrecPEDVs	entstandene recPEDVs
vNotI/tk	pA	vrecPEDV-MN-1-gpt-8	-
vrec-PEDV-MN-1-gpt-8	pB	vrecPEDV-MN-1-2-7-8	-
vrec-PEDV-MN-1-2-7-8	pC	vrecPEDV-MN-1-2-3-gpt-6-7-8	-
vrec-PEDV-MN-1-2-3-gpt-6-7-8	pD	vrecPEDV-MN	-
vrecPEDV-MN	pGPT-Δ3	vrecPEDV-MN-gpt-Δ3	-
vrecPEDV-MN-gpt-Δ3	pΔ3-GFP	vrecPEDV-MN-S <sub>MN</sub> -Δ3-GFP	-
vrecPEDV-MN-S <sub>MN</sub> -Δ3-	pGPT-ΔS-	vrecPEDV-MN-gpt-ΔS-Δ3-GFP	-

GFP	GFP		
pS <sub>CV777</sub> -GFP	pS <sub>CV777</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	-
vrecPEDV-MN-S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	pGPT-Δ5'UTR	vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR - S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	-
vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	p5'UTR <sub>CV777</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP
vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	p5'UTR <sub>MN-ΔT48</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP
vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	p5'UTR <sub>MN-C99T</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-C99T</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-C99T</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP
vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	p5'UTR <sub>MN-ΔT48, C99T</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48, C99T</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>MN-ΔT48, C99T</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -Δ3-GFP	pGPT-GFPΔ3	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP-gpt-Δ3	-
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP-gpt-Δ3	pGFP-3	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub> -GFP	pGPT-ΔS-GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	-
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -GFP	-
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN-F226S, L375F</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F</sub> -GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, L375F</sub> -GFP
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN-F226S, H486P</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-F226S, H486P</sub> -GFP	-
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP	recPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS-GFP	pS <sub>MN-L375F</sub> -GFP	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F</sub> -GFP	-

vrecPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> - GFP	pGPT-ΔGFP- Δ3	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -gpt-ΔGFP-Δ3	-
vrecPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> - gpt-ΔGFP-Δ3	p3	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub>	recPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub>
vrecPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> - gpt-ΔGFP-Δ3	p3 <sub>CV777</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -3 <sub>CV777</sub>	recPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub> -3 <sub>CV777</sub>
vrecPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN-L375F, H486P</sub>	pGPT-ΔS	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt- ΔS	-
vrecPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -gpt-ΔS	pS <sub>CV777</sub>	vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> - S <sub>CV777</sub>	recPEDV-MN- 5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>CV777</sub>

**Tab. 2: Für Selektionen verwendete Ausgangs-Vacciniaviren, Selektionsplasmide, daraus entstandene rekombinante Vacciniaviren (vrecPEDVs) und rekombinante PEDVs (recPEDVs)**

Eine detaillierte Beschreibung der zur Generierung rekombinanter Vacciniaviren verwendeten Selektionsplasmide ist in Tab. 3 dargestellt. Plasmide für die Positivselektion basieren dabei auf pGPT-1 (Hertzog et al. 2004), wobei die für die Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination benötigten Genabschnitte jeweils *upstream* und *downstream* des *gpt*-Gens in das Plasmid eingefügt wurden. Für die Negativselektionsplasmide wurde als Vektor entweder pGEM®-T (Promega) oder pUC57 (Genscript) gewählt.

<b>Selektions-plasmid</b>	<b>Vektor</b>	<b>eingeführte Genabschnitte</b>
pA	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : vNotI/tk nt 113832-113993; T7-Promotor; PEDV MN nt 1-3500 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 23551-28038; Poly-A-Schwanz; <i>NotI</i> -Schnittstelle; Hepatitis Delta Ribozym-Sequenz (HDR)
pB	pUC57	PEDV MN nt 3001-7000 PEDV MN nt 20000-23999
pC	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 6500-10500 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 16501-20500
pD	pUC57	PEDV MN nt 10050-17000
pGPT-Δ3	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 24300-24793 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 25419-25920

pΔ3-GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 24300-24793, GFP-Sequenz und PEDV MN nt 25419-25920
pGPT-ΔS-GFP	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 20130-20633 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : GFP nt 1-500
pS <sub>CV777</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-20633, S <sub>CV777</sub> (nt 20638-24789) und GFP nt 1-500
pGPT-Δ5'UTR	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : vNotI/tk nt 113594-113993; T7-Promoter <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 293-740
p5'UTR <sub>CV777</sub>	pGEM-T	vNotI/tk nt 113594-113993; T7-Promoter; 5'UTR <sub>CV777</sub> (nt 1-291) und PEDV MN nt 293-740
p5'UTR <sub>MN-ΔT48</sub>	pGEM-T	vNotI/tk nt 113594-113993; T7-Promoter und PEDV MN nt 1-740 mit Deletion von T an Position 48
p5'UTR <sub>MN-C99T</sub>	pGEM-T	vNotI/tk nt 113594-113993; T7-Promoter und PEDV MN nt 1-740 mit Substitution von C an Position 99 durch T
p5'UTR <sub>MN-ΔT48, C99T</sub>	pGEM-T	vNotI/tk nt 113594-113993; T7-Promoter und PEDV MN nt 1-740 mit Deletion von T an Position 48 und Substitution von C an Position 99 durch T
pGPT-GFPΔ3	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : GFP nt 200-721; PEDV MN nt 25419-25448 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 25419-25920
pGFP-3	pGEM-T	GFP nt 200-721 und PEDV MN nt 24746-25920
pS <sub>MN</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 und GFP nt 1-500
pS <sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 mit Substitution T an Position 21309 durch C, T an Position 21722 durch C, A an Position 22089 durch C und GFP nt 1-500
pS <sub>MN-F226S, L375F</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 mit Substitution T an Position 21309 durch C, T an Position 21722 durch C und GFP nt 1-500
pS <sub>MN-F226S, H486P</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 mit Substitution T an Position 21309 durch C, A an Position 22089 durch C und GFP nt 1-500
pS <sub>MN-L375F, H486P</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 mit Substitution T an Position 21722 durch C, A an Position 22089 durch C und GFP nt 1-500
pS <sub>MN-L375F</sub> -GFP	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-24793 mit Substitution T an Position 21722 durch C und GFP nt 1-500
pGPT-ΔGFP-Δ3	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 24395-24794 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN 25419-25920
p3	pGEM-T	PEDV MN nt 24395-25920



p3 <sub>CV777</sub>	pGEM-T	PEDV MN nt 24395-25037 und 25087-25920
pGPT-ΔS-GFP	pGPT-1	<i>upstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 20130-20633 <i>downstream</i> von <i>gpt</i> : PEDV MN nt 24800-25300
pS <sub>CV777</sub>	pGEM-T	PEDV MN nt 20130-20633, S <sub>CV777</sub> (nt 20638-24789) und PEDV MN nt 24795-25300

Tab. 3: Selektionsplasmide zur Generierung rekombinanter vPEDVs

## 2.2.8 Experimentelle Infektion von SPF-Ferkeln

### 2.2.8.1 Infektion von Ferkeln mit rekombinanten PEDVs

Zur Untersuchung der Virulenz der in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten PEDVs wurden Tierversuche im Hochsicherheitslabor des Instituts für Virologie und Immunologie, Standort Mittelhäusern, Schweiz, durchgeführt, an welchen die Verfasserin dieser Arbeit aktiv teilnahm. Die verwendeten spezifisch pathogenfreien (SPF) Ferkel der Rasse „Edelschwein“ stammten aus der hauseigenen Zucht des Instituts. Nach stochastischer Einteilung der Tiere in Gruppen à 6 Ferkel wurden diese im Alter von 7 Tagen oral mit je 10<sup>4</sup> PFU der folgenden rekombinanten PEDVs infiziert: recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L374F, H486P</sub>; recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> sowie recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L374F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>. Zwei weitere Gruppen wurden mit dem zellkulturadaptierten Stamm CV777 sowie dem US-Feldstamm NPL2013 (11. Zellkulturpassage) inokuliert. Als Kontrolle erhielt eine Gruppe nur Zellkulturmedium als Inokulum. Pro Tiergruppe wurden 2 weitere Ferkel 48 Stunden nach der Infektion eingestellt, um die Virusübertragung untersuchen zu können. Nach der Infektion erfolgte eine tägliche klinische Untersuchung der Tiere mit Entnahme von Rektal- und Oronasaltupferproben, welche anschließend in Medium aufbereitet und eingefroren wurden. Die Entnahme von Blutproben zur Serumgewinnung erfolgte im Abstand von 2 Tagen. Je nach klinischem Zustand wurde ein Teil der Ferkel 4, der Rest 7 Tage *post infectionem* euthanasiert und einer pathologischen Untersuchung unterzogen, welche die Entnahme von Organproben für RNA-Präparation, Histologie und Immunhistochemie beinhaltete.

### 2.2.8.2 Probenauswertung

Die Bearbeitung und Auswertung der Tupfer-, Blut- und Organproben fand am Institut für Virologie und Immunologie, Standort Bern und Mittelhäusern, Schweiz, statt. Die Verfasserin dieser Arbeit leistete dabei Unterstützung, größtenteils fand die Probenbearbeitung durch Peter Rogger statt. Zum Nachweis der Virusausscheidung und der Organverteilung wurde aus den Proben RNA isoliert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Die pathohistologische und immunhistochemische (IHC) Untersuchung der Organproben wurden durch Inês Veiga und Prof. Horst Posthaus am Institut für Tierpathologie, Bern, Schweiz,

durchgeführt. Hierbei wurde neben der histologischen Untersuchung aller Organproben nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung ebenfalls eine Längenmessung der intestinalen Villi mit nachfolgender statistischer Analyse vorgenommen. Der immunhistochemische Virusnachweis wurde durch Färbung der Organproben mit einem monoklonalen, gegen das M-Protein von PEDV gerichteten Mäuseantikörper (mAb204), wie bereits beschrieben, durchgeführt (Guscetti et al. 1998, Utiger et al. 1993).

## 3 Ergebnisse

Revers-genetische Systeme sind ein wichtiges Instrument, um die molekulare Pathogenese coronaviraler Erkrankungen zu studieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein revers-genetisches System für den hochvirulenten nordamerikanischen PEDV-Stamm „Minnesota“ (MN) etabliert. Um Virulenzfaktoren von PEDV zu identifizieren, wurde eine Reihe von rekombinanten PEDVs hergestellt, welche anschließend in Versuchen mit neugeborenen Ferkeln *in vivo* charakterisiert wurden.

### 3.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für PEDV Minnesota

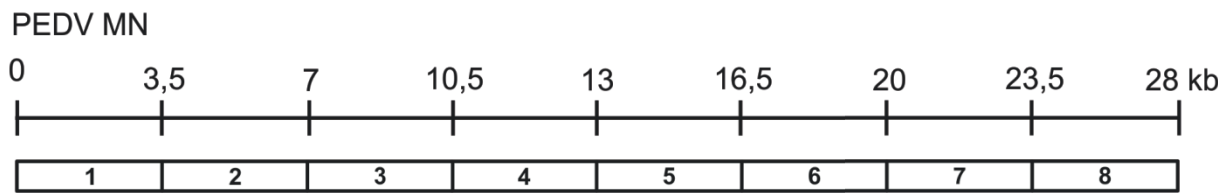
Da zu Beginn dieser Arbeit kein hochvirulentes US-Virusisolat im institutseigenen Labor verfügbar war, wurde für die Erstellung eines infektiösen PEDV-cDNA-Klons auf die Datenbanksequenz des Stammes Minnesota zurückgegriffen. Diese war als eine der ersten Sequenzen von hochvirulenten nordamerikanischen PEDV-Stämmen in der Genbank-Datenbank (Akzessionsnummer KF468752) verfügbar und wurde aus Ferkeln mit dem Erscheinungsbild schwerer klinischer PED isoliert (Huang et al. 2013).

#### 3.1.1 Einführung der kompletten PEDV-Stamm-MN-cDNA in das Vacciniavirusgenom

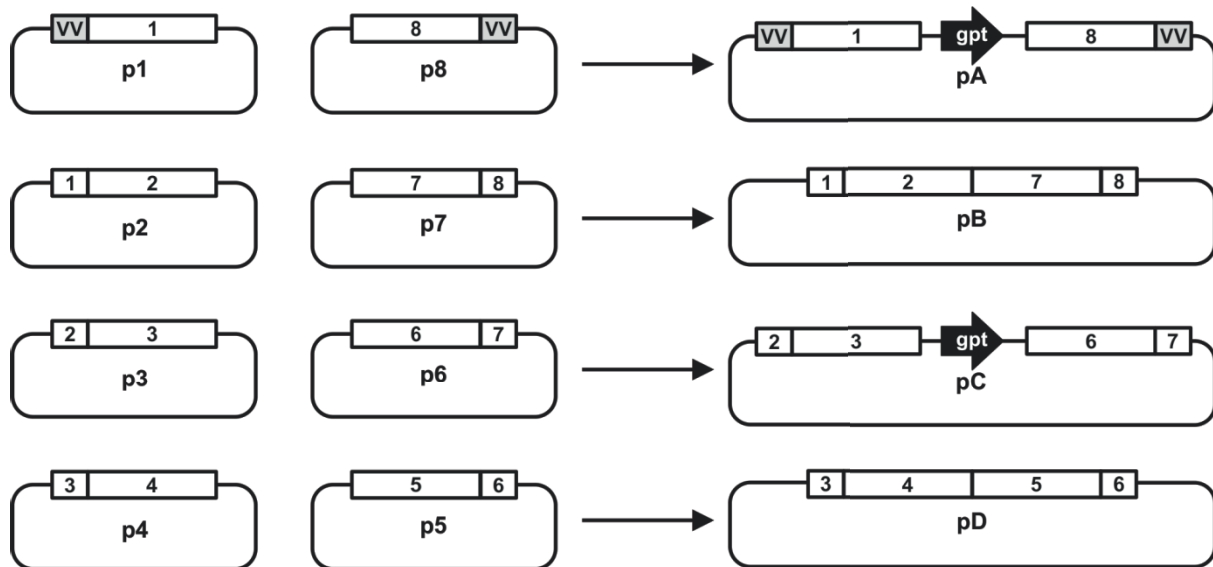
##### 3.1.1.1 Herstellung der Selektionsplasmide zur Generierung von vrecPEDV-MN

Basierend auf der Datenbanksequenz von PEDV MN wurden 8 überlappende cDNA-Fragmente, welche das komplette PEDV-MN-Genom abdecken, synthetisiert und in 8 Plasmide p1-p8 kloniert (Genscript) (2.1.3). Für die Einführung der PEDV-cDNA in das Vacciniavirusgenom wurden die Fragmente aus p1-p8 anschließend in 4 Plasmide (pA, pB, pC, pD) subkloniert (2.2.6.1). Diese dienten als Selektionsplasmide für die Integration der kompletten PEDV-cDNA in das Vacciniavirusgenom (Tekes 2016). Abb. 13 zeigt die Übersicht über die generierten Plasmide.

## A



## B

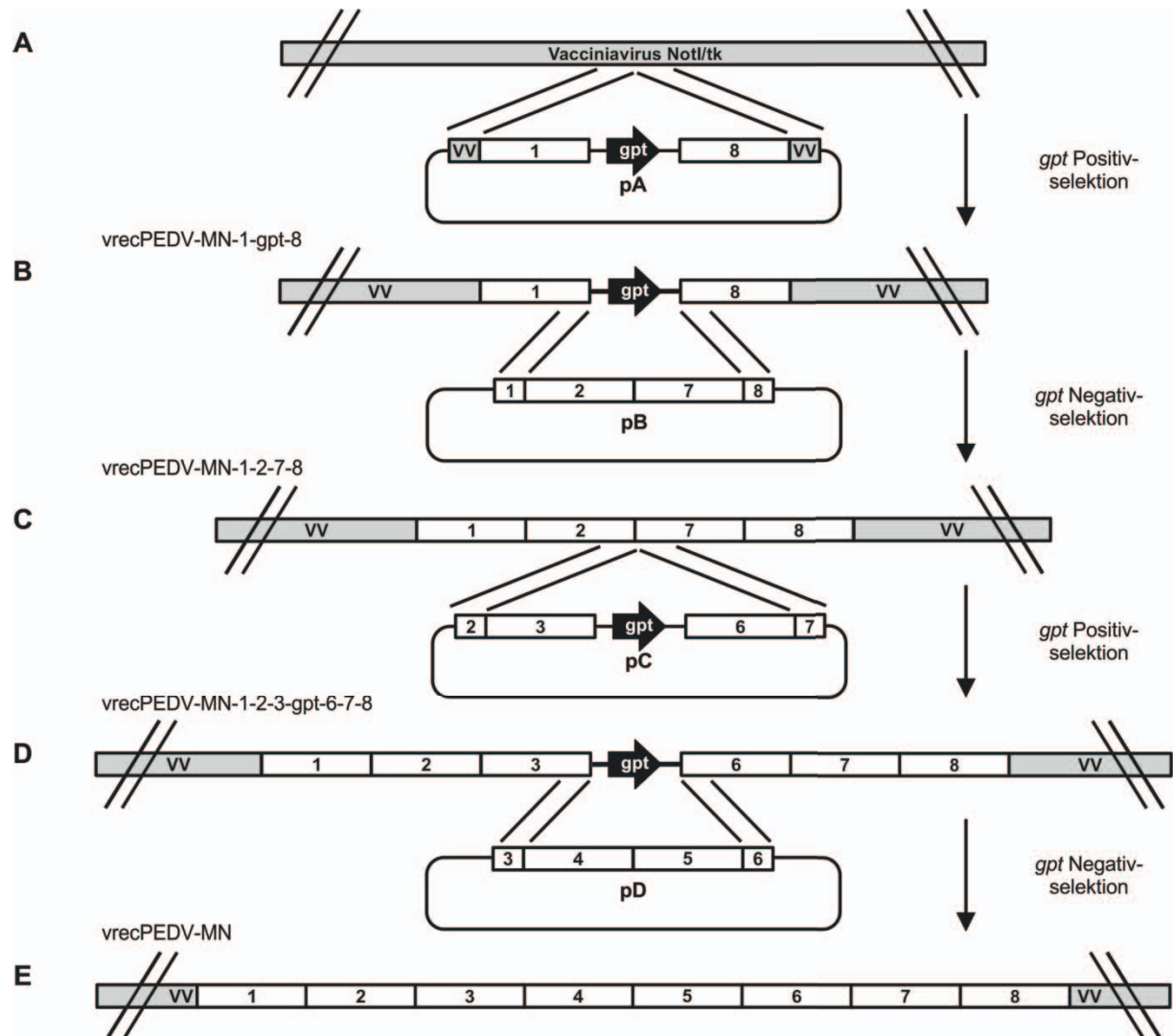


**Abb. 13: Selektionsplasmide für die Einführung der PEDV-MN-cDNA in das Vacciniavirusgenom.** (A) Das PEDV-MN-Genom wurde in 8 überlappende Fragmente à 2,5-4,5 kb eingeteilt. (B) Alle 8 Fragmente wurden von der Firma Genscript, Piscataway, USA synthetisiert und kloniert. Dadurch entstanden 8 Plasmide (p1-p8). Anschließend wurden die Fragmente 1-8 subkloniert um die Selektionsplasmide (pA-pD) zu erhalten (*gpt*: Guanin-Phosphoribosyltransferase).

### 3.1.1.2 Generierung von vrecPEDV-MN

Für die Einführung der gesamten PEDV-MN-cDNA in das Vacciniavirusgenom waren 4 Selektionsschritte erforderlich (Tekes 2016) (Abb. 14). Im ersten Schritt wurden mit dem Vaccinavirus vNotI/tk infizierte CV-1-Zellen mit Plasmid pA (2.2.6.1) transfiziert (2.2.5.2.1) (Abb. 14A). Das durch Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination entstandene vrecPEDV-MN-1-gpt-8 beinhaltete nun die Nukleotide 1-3500 sowie 23551-28038 des PEDV-MN-Genoms mit anschließendem Poly-A-Schwanz und konnte durch Positivselektion (2.2.5.2.2) basierend auf dem *gpt*-Gen (Guanin-Phosphoribosyltransferase) selektiert werden. Dieses rekombinante Vacciniavirus wurde im nächsten Schritt für die Transfektion mit pB eingesetzt (Abb. 14B). Nach homologer Rekombination wurde das *gpt*-Gen durch die Nukleotide 3501-7000 und 20000-23550 von PEDV MN ersetzt und das entstandene vrecPEDV-MN-1-2-7-8 konnte durch Negativselektion isoliert werden (2.2.5.2.3). Dieses

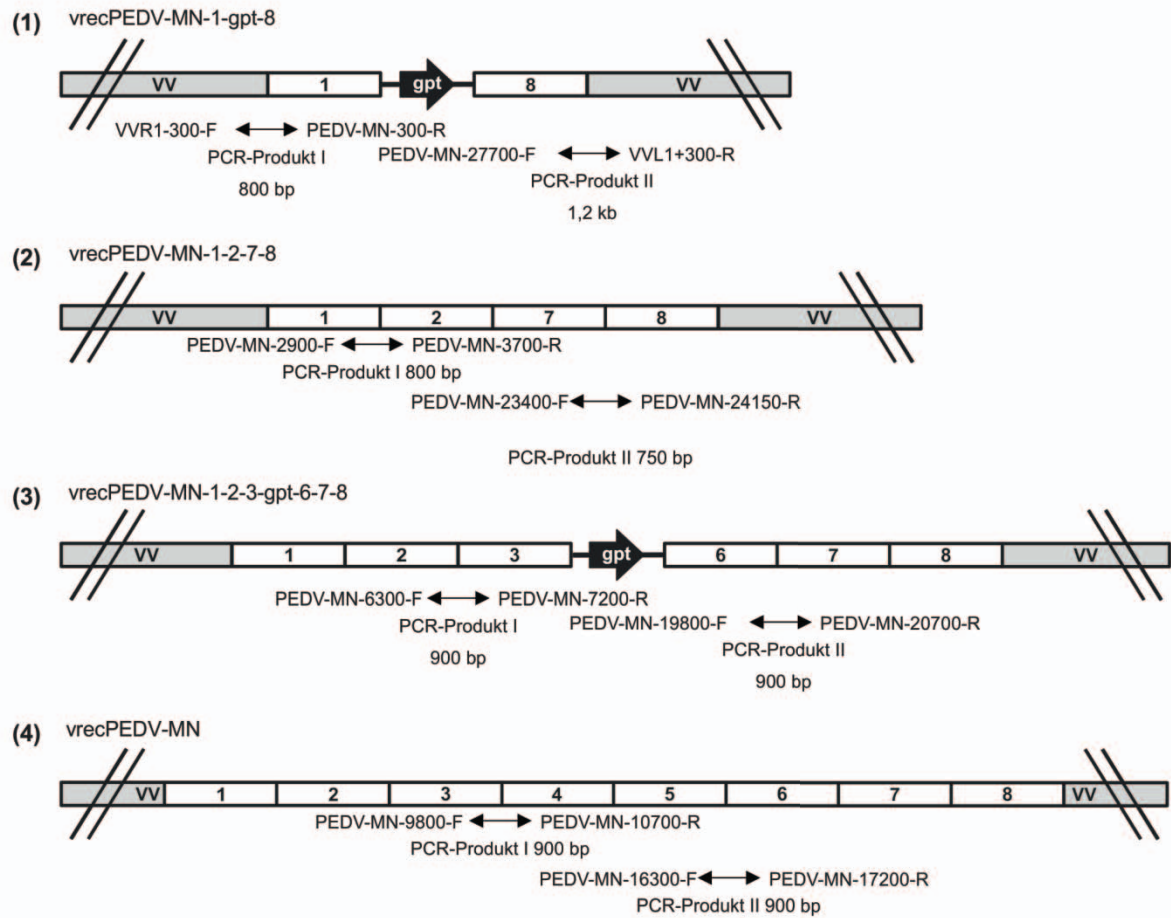
diente als Ausgangsvirus für die folgende Positivselektionsrunde, bei der nach Transfektion mit pC Nukleotid 7001-10500 des PEDV-Genoms *upstream* und 16501-19999 *downstream* des *gpt*-Gens integriert wurden und vrecPEDV-MN-1-2-3-gpt-6-7-8 entstand (Abb. 14C). Durch eine Negativselektionsrunde wurden nach Infektion mit vrecPEDV-MN-1-2-3-gpt-6-7-8 und Transfektion mit pD die noch fehlenden Nukleotide 10501-16500 der PEDV-cDNA eingeführt (Abb. 14D). Dadurch entstand das rekombinante Vacciniavirus vrecPEDV-MN, welches die komplette PEDV-MN-cDNA beinhaltet (Abb. 14E).



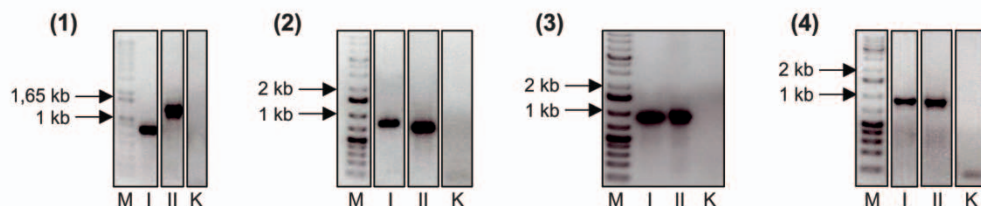
**Abb. 14: Generierung von vrecPEDV-MN.** Darstellung der Einführung der PEDV-MN-cDNA (Fragmente 1-8, weiß) in das Vacciniavirusgenom (VV, grau). Ein waagrecht, schwarzer Pfeil symbolisiert das *gpt*-Gen (*gpt*: Guanin-Phosphoribosyltransferase). Schwarze Linien zwischen Ausgangsvirus und Selektionsplasmid zeigen die Rekombinationsstellen.

Nach jeder durchgeführten Selektionsrunde wurde die korrekte Integration der entsprechenden PEDV-cDNA im Bereich der Rekombinationsstellen durch PCR und anschließende Sequenzierung überprüft (Abb. 15).

**A**

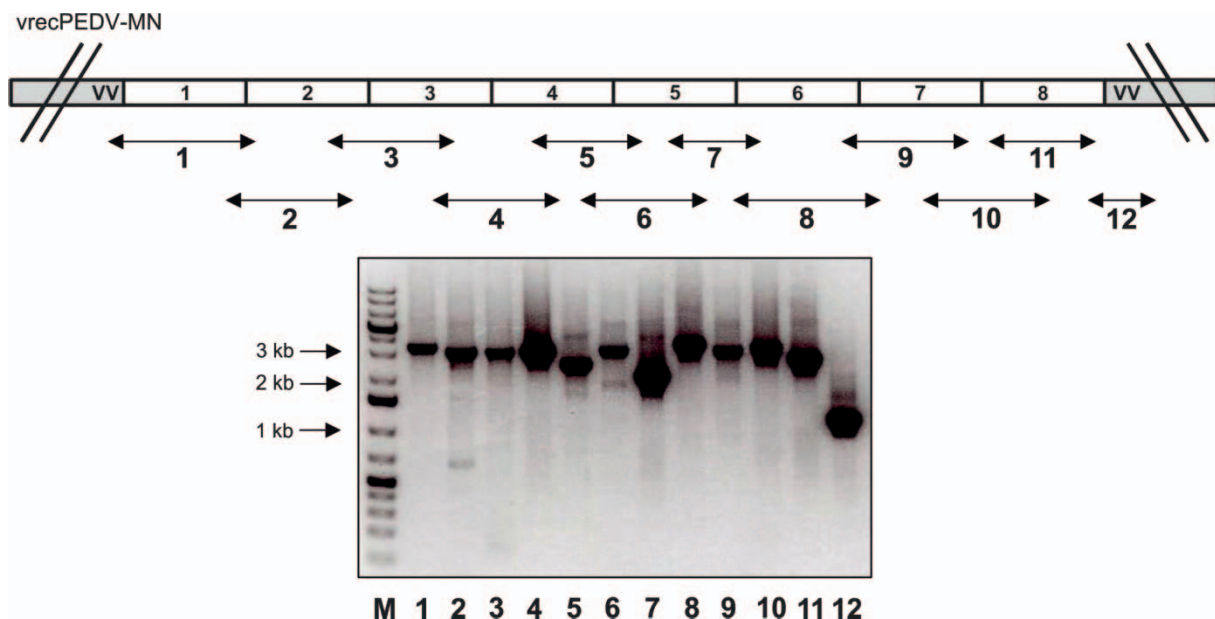


**B**



**Abb. 15: PCR-Fragmente zur Kontrolle der Selektionsrunden bei der Herstellung von vrecPEDV-MN.** (A) Die zur Kontrolle der Selektionsrunden bei der Herstellung von vrecPEDV-MN-1-gpt-8 (1), vrecPEDV-MN-1-2-7-8 (2), vrecPEDV-MN-1-2-3-gpt-6-7-8 (3) und vrecPEDV-MN (4) verwendeten Primer sind dargestellt. (B) Die zugehörigen PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

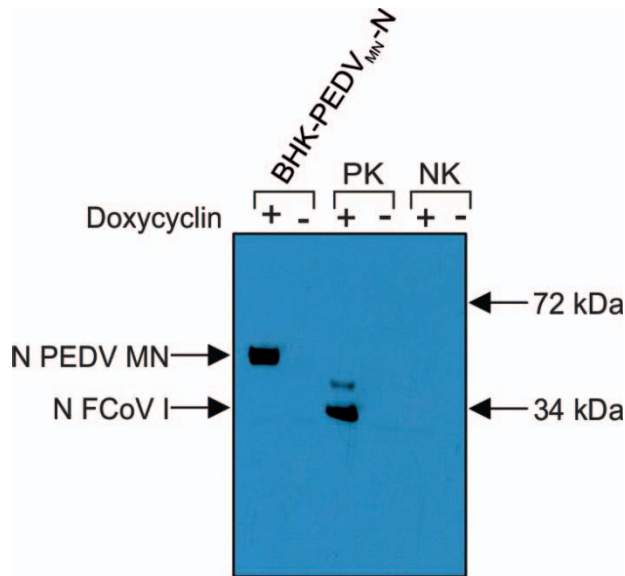
Nach Herstellung von vrecPEDV-MN und Plaquereinigung (2.2.5.2.3) wurde die Vollständigkeit der PEDV-cDNA im Vacciniavirusgenom durch Amplifikation der kompletten PEDV-cDNA in 12 überlappenden PCR-Produkten (2.2.5.2.3, Abb. 12) mit nachfolgender Sequenzierung bestätigt (Abb. 16).



**Abb. 16: Vollständigkeitskontrolle der gesamten PEDV-cDNA in vrecPEDV-MN.** Die PEDV-MN-cDNA wurde in 12 überlappenden Fragmenten (1-12) amplifiziert (Primer siehe 2.2.5.2.3, Abb. 12) und auf einem 1,5%igen Agarosegel dargestellt (M: DNA-Größenmarker).

### 3.1.2 Herstellung einer BHK-Zelllinie, die das N-Protein von PEDV MN induzierbar exprimiert

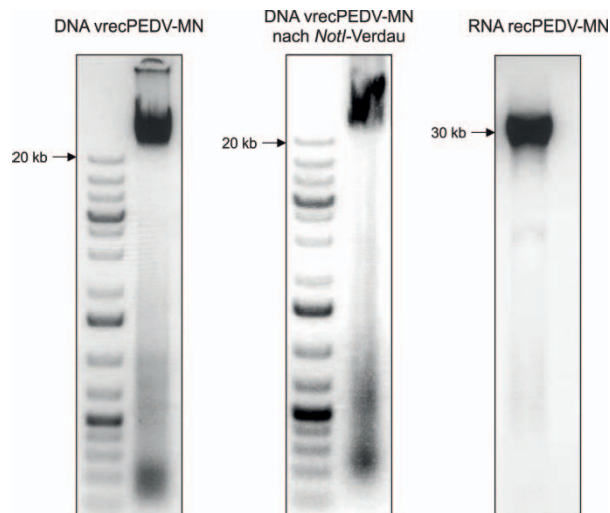
Für die Herstellung rekombinanter Coronaviren von cDNA-Klonen (*Rescue*) (2.2.5.3) wird eine Zelllinie, die das homologe N-Protein exprimiert, benötigt (Casais et al. 2001, Coley et al. 2005, Tekes et al. 2010, Tekes et al. 2008, Tekes et al. 2012, Yount et al. 2002). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine BHK-Zelllinie generiert, welche das N-Protein von PEDV MN induzierbar durch Doxycyclin-Zugabe exprimiert (Tet-on-System) (2.2.1.6). Das zu transfizierende Plasmid pTREhyg-PEDV-N-flag enthielt dabei einen FLAG-Tag am C-Terminus des N-Proteins, da zu Beginn dieser Arbeit noch keine monoklonalen Antikörper zur Detektion des N-Proteins von PEDV verfügbar waren. Nach Transfektion von BHK-Tet/ON-Zellen (Norbert Tautz, Universität Lübeck) wurden Zellklone mit Hygromycin selektiert. Die Expression des N-Proteins wurde in einem Western Blot unter Verwendung eines ANTI-FLAG® M2-Antikörpers nachgewiesen (2.2.7) (Abb. 17).



**Abb. 17: Detektion der N-Expression von BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen im Western Blot.** Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde die Bildung des N-Proteins in induzierten (Doxycyclin+) und nicht induzierten (Doxycyclin-) Zelllysaten mit einem monoklonalen ANTI-FLAG®-Antikörper überprüft. Die Kontrolle des Experiments (PK) erfolgte durch den Nachweis des N-Proteins von FCoV I in BHK-FCoVI-N-Zellen (Tekes et al. 2008). Als Negativkontrolle (NK) wurden induzierte sowie nicht induzierte BHK-Tet/ON-Zellen (Norbert Tautz, Universität Lübeck) eingesetzt.

### 3.1.3 Herstellung von *in-vitro*-transkribierter PEDV-MN-RNA und Elektroporation in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen

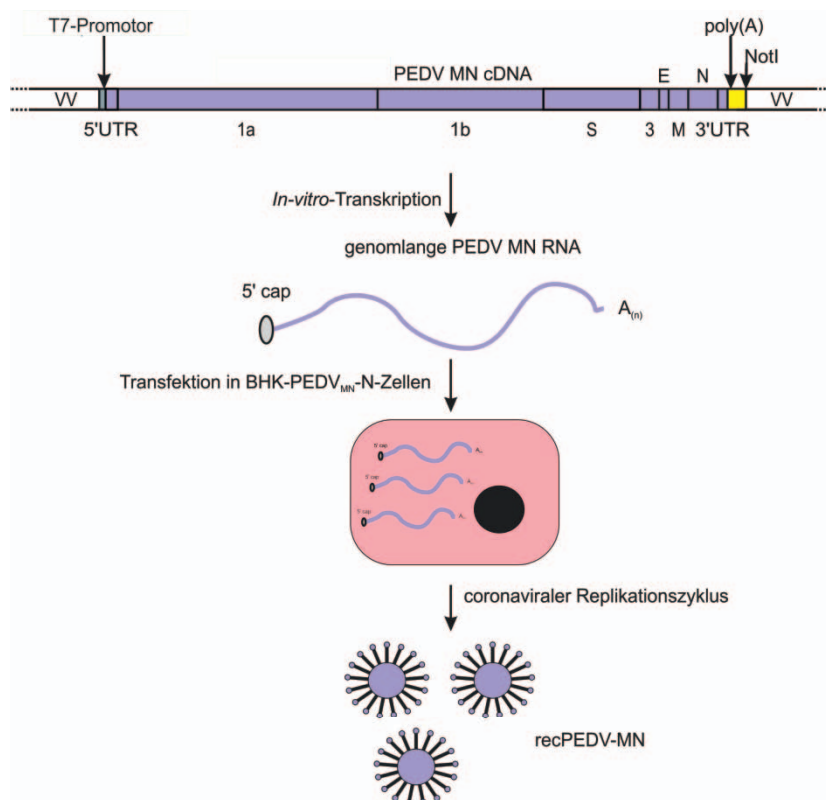
Als Ausgangsmaterial zur Herstellung rekombinanter PEDVs (*Rescue*) (2.2.6.2) wurde DNA von vrecPEDV-MN im präparativen Maßstab hergestellt (2.2.3.2.2.1) und anschließend einem Restriktionsverdau mit *NotI* unterzogen. Dieser ermöglicht die Herstellung *in-vitro*-transkribierter recPEDV-RNAs mit einem exakt definierten 3'-Ende. Sowohl die im präparativen Maßstab hergestellte vrec-PEDV-MN-DNA als auch die *NotI*-verdaute DNA wurden zur Qualitätskontrolle auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 18).



**Abb. 18: Überprüfung der Qualität von vrecPEDV-MN-DNA und recPEDV-RNA.** Darstellung von je 1,5 µl DNA vor und nach *NotI*-Restriktionsverdau auf einem 1,5%igen Agarosegel und 2,0 µl *in-vitro*-transkribierter RNA auf einem 1,2%igen Agarosegel.

Die mit dem *NotI*-Enzym verdaute DNA diente anschließend als Vorlage für die *In-vitro*-Transkription zur Herstellung genomlanger recPEDV-MN-RNA (Abb. 18), welche daraufhin in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert wurde (2.2.1.5.2). Da die coronavirale RNA positiv orientiert ist, führt die Elektroporation in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen zur Initiierung des Replikationszyklus und zur Herstellung/Freisetzung rekombinanter Coronaviren (Abb. 19).





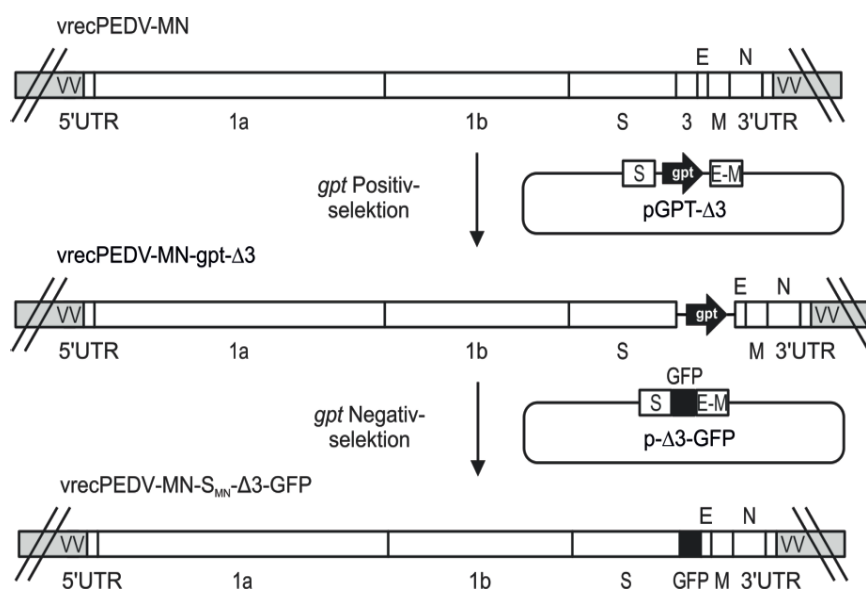
**Abb. 19: Schematische Darstellung des Rescues von rekombinanten PEDVs.** Genomlange recPEDV-RNA wird nach *In-vitro*-Transkription in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert, in welchen der coronavirusale Replikationszyklus startet.

48 Stunden nach Elektroporation wurde der Zellkulturüberstand geerntet und für die Infektion von Vero-Zellen verwendet. Da für eine Synzytienbildung und Ausbreitung von PEDV in Zellkultur eine proteolytische Spaltung des S-Proteins durch Trypsin erforderlich ist (1.2.4), wurde 48 Stunden nach Infektion Trypsin zum Kulturmedium zugegeben (2.2.1.4). Eine Infektion konnte jedoch weder anhand eines zytopathischen Effekts noch mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.1.7) gezeigt werden. Auch nach mehreren Anläufen konnte die Herstellung rekombinanter PEDVs nicht nachgewiesen werden.

### 3.2 Substitution von S<sub>MN</sub> in vrecPEDV-MN durch das S-Gen des zellkulturadaptierten Stammes CV777

Die Isolierung und Zellkulturpropagation von PEDV-Feldstämmen stellt eine große, nicht immer erfolgreich zu bewältigende, Herausforderung dar (Chen, Q. et al. 2014, Hofmann, M. & Wyler 1988, Oka et al. 2014). Für den Feldstamm MN waren keine Literaturangaben zur Kultivierbarkeit verfügbar. Das coronavirusale Spike-Protein ist verantwortlich für Rezeptorbindung und Zellfusion und ist somit die Hauptdeterminante für Zelltropismus und die Kultivierbarkeit *in vitro* (Li, W. et al. 2016, Li, W. et al. 2015, Millet & Whittaker 2015, Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011). Um zu überprüfen, ob das S-Gen des Stammes MN dem mangelndem Erfolg bei der Herstellung von rec-PEDV-MN zugrunde liegt, wurde im Folgenden das S-Gen in vrecPEDV-MN durch das des zellkulturadaptierten Stammes CV777 ersetzt. Weiterhin wurde Gen 3 durch ein GFP-Gen (*green fluorescent protein*)

ersetzt. Dies geschah aus den folgenden Gründen: Zum einen erleichtert die Insertion von Reportergenen in Coronavirusgenome die Charakterisierung dieser Viren (Hertzog et al. 2004, Tekes et al. 2008, Thiel et al. 2001), zum anderen konnte in einigen Studien ein hemmender Effekt von Gen 3 auf die Replikation von PEDV *in vitro* gezeigt werden (Jengarn et al. 2015, Wongthida et al. 2017). Für die Generierung von vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP wurde im ersten Schritt das Gen 3 durch das GFP-Gen ersetzt. Dies geschah durch Transfektion von mit vrecPEDV-MN infizierten CV-1-Zellen mit dem Plasmid pGPT-Δ3 und anschließende Isolierung von vrecPEDV-MN-gpt-Δ3 in einer Positivselektion. Die entstehenden Viren dienten als Ausgangsmaterial für die Transfektion mit pΔ3-GFP mit nachfolgender Negativselektion zur Generierung von vrecPEDV-MN-S<sub>MN</sub>-Δ3-GFP (Abb. 20).

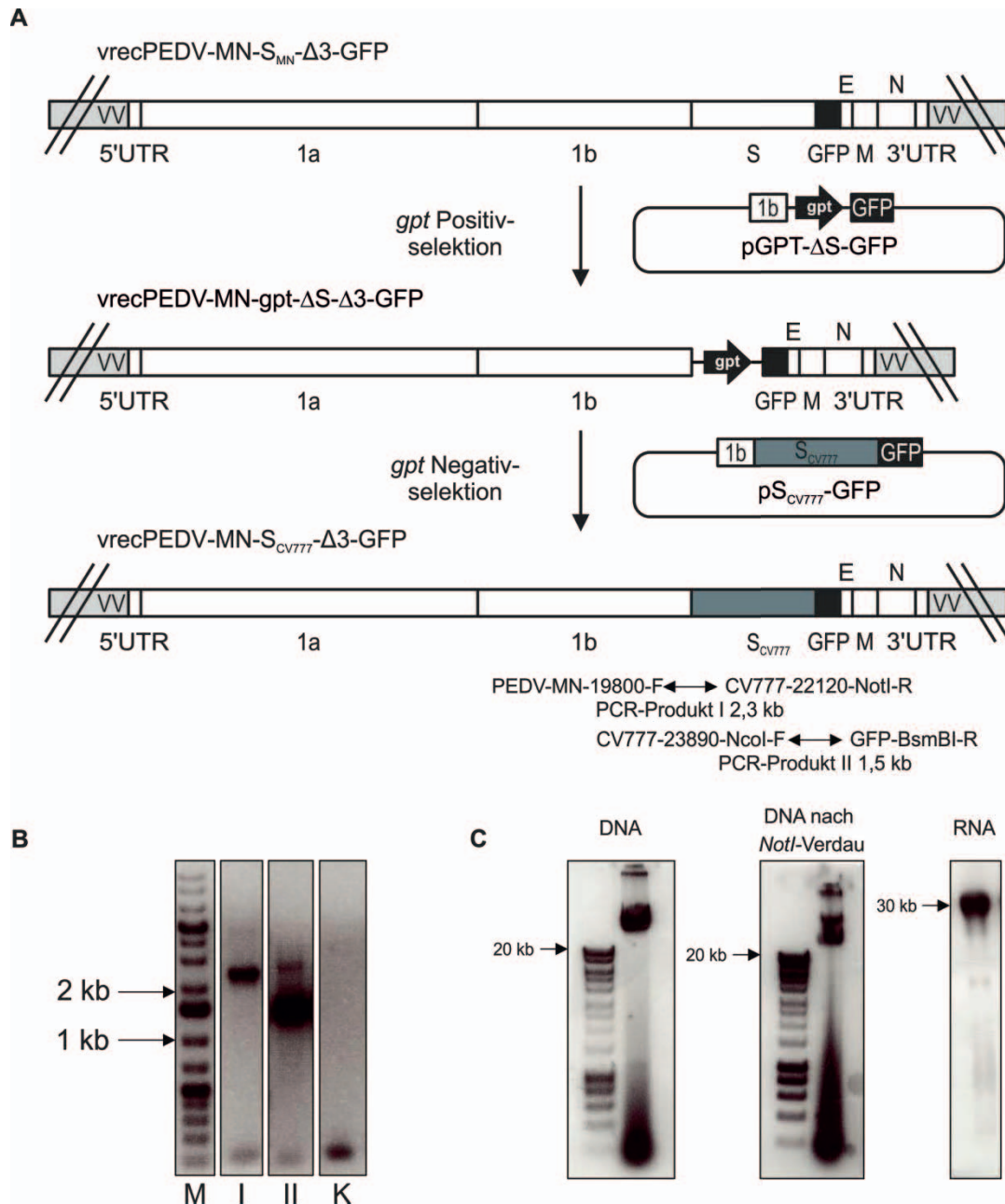


**Abb. 20: Herstellung von vrecPEDV-MN-S<sub>MN</sub>-Δ3-GFP.**

Durch homologe Rekombination wurde das Gen 3 in vrecPEDV-MN durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt. Dieses wurde im nächsten Schritt durch das GFP-Gen (*green fluorescent protein*, schwarz) substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, Vacciniavirusgenom hellgrau dargestellt.

Zur Generierung eines rekombinanten Vacciniavirus, welches S<sub>CV777</sub> anstelle von S<sub>MN</sub> enthält (vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP), wurden CV-1-Zellen mit vrecPEDV-MN-S<sub>MN</sub>-Δ3-GFP infiziert und mit pGPT-ΔS-GFP transfiziert. Das resultierende Virus vrecPEDV-MN-gpt-ΔS-Δ3-GFP wurde in einer Positivselektion isoliert und für die Transfektion mit pS<sub>CV777</sub>-GFP eingesetzt (Abb. 21A). Nach anschließender Negativselektion von vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP wurde der Selektionserfolg durch die Amplifikation von Fragmenten im Bereich der Rekombinationsstellen nachgewiesen (Abb. 21A und B). Daraufhin erfolgte eine Plaquereinigung des rekombinanten Virus mit anschließender Vollständigkeitskontrolle der PEDV-cDNA in 12 überlappenden PCR-Fragmenten. Nach Herstellung von vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP-DNA im präparativen Maßstab und Generierung von *in-vitro*-transkribierter RNA (Abb. 21C) wurde diese in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert. Der Elektroporationsüberstand wurde schließlich zur Infektion von Vero-Zellen verwendet. Überraschenderweise konnten jedoch weder ein GFP-Signal noch ein zytopathischer Effekt nachgewiesen werden, auch in der indirekten Immunfluoreszenz konnte kein virales Antigen

detektiert werden. Als Ursache für den mangelnden Erfolg bei der Herstellung rekombinanter PEDVs wurden daher mögliche Fehler in der Datenbanksequenz, welche außerhalb des S-Gens liegen, vermutet.

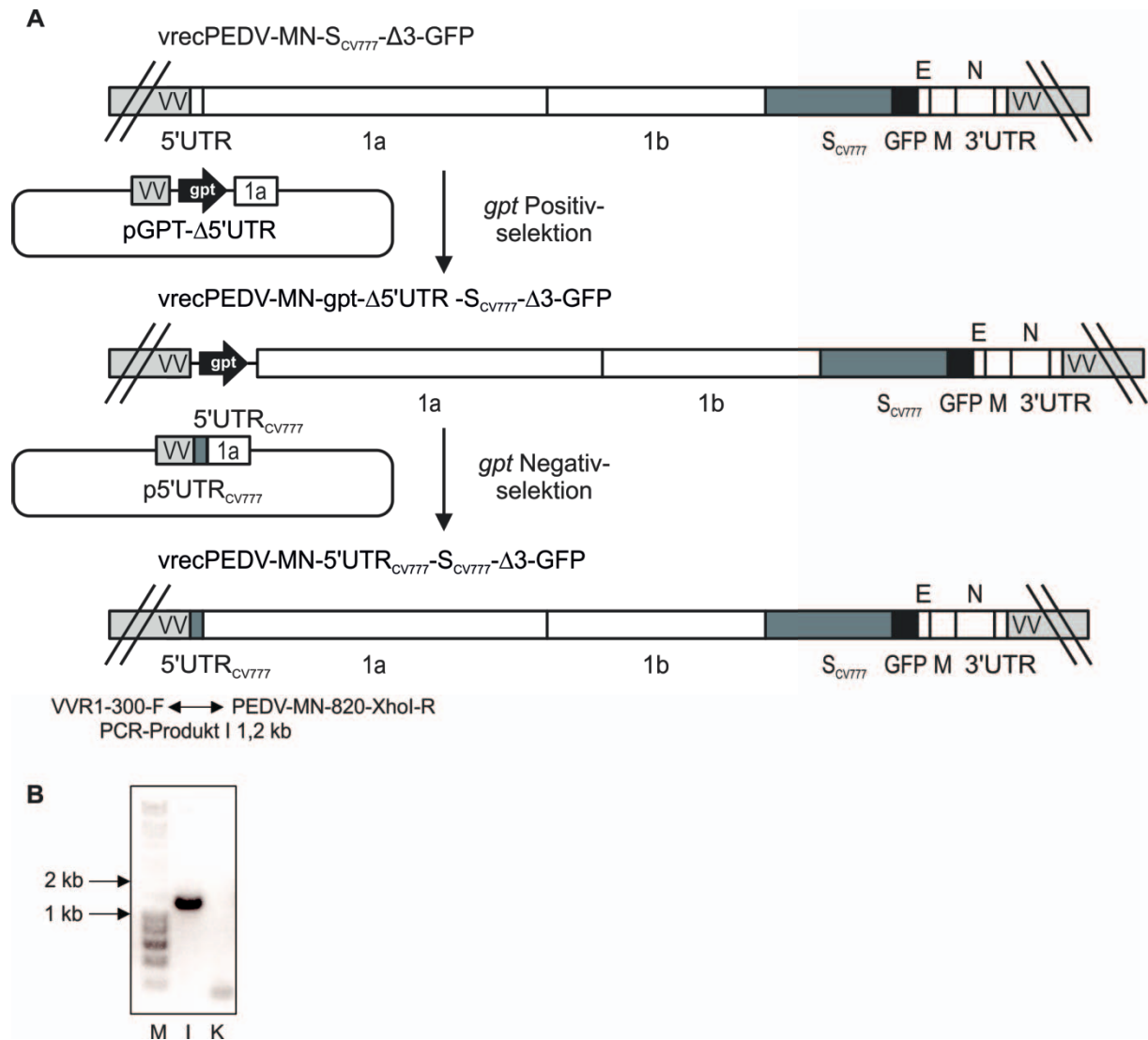


**Abb. 21: Herstellung von vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP.** (A) Durch homologe Rekombination wurde das S-Gen in vrecPEDV-MN-S<sub>MN</sub>-Δ3-GFP durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt. Dieses wurde im nächsten Schritt durch das S<sub>CV777</sub>-Gen (grau) substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Die PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus). (C) Je 1,5 µl vrecPEDV-MN-S<sub>MN</sub>-Δ3-GFP-DNA vor und nach *NotI*-Restriktionverdau wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Von der *in-vitro*-transkribierten RNA wurden 2,0 µl auf einem 1,2%igen Agarosegel dokumentiert.

### 3.3 Herstellung rekombinanter PEDVs mit S<sub>CV777</sub> durch Austausch der 5'UTR<sub>MN</sub> gegen 5'UTR<sub>CV777</sub>

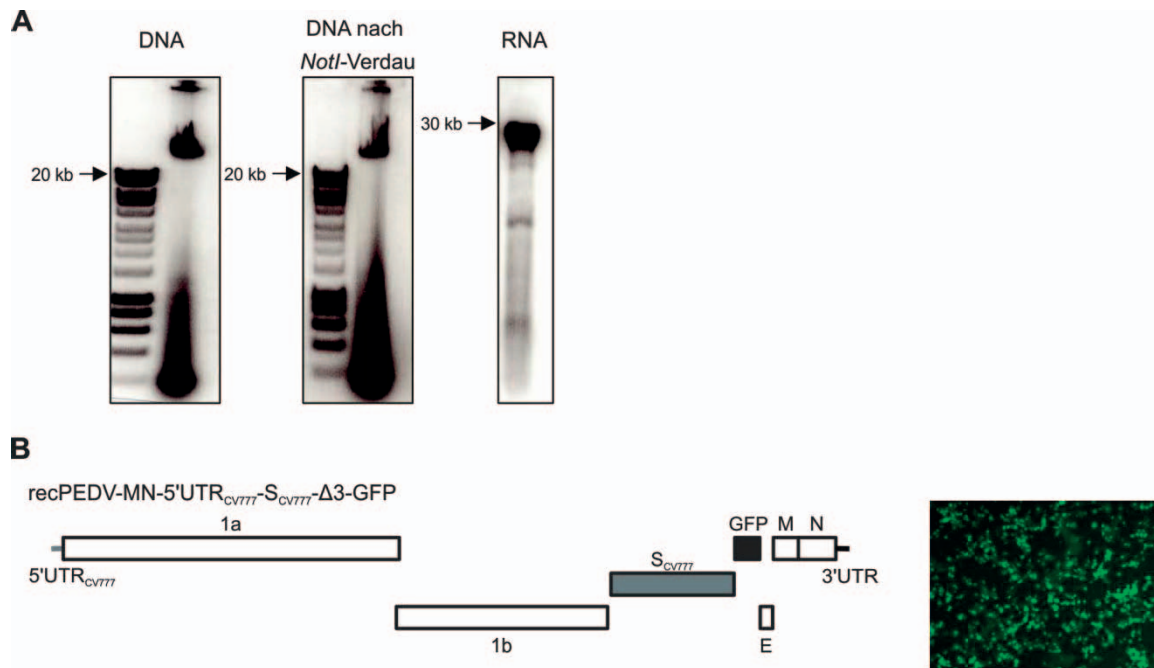
#### 3.3.1 Herstellung eines recPEDV mit 5'UTR<sub>CV777</sub> und S<sub>CV777</sub>

Im Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem erfolglosen *Rescue* rekombinanter PEDVs zur 5'UTR-Sequenz der Datenbanksequenz von PEDV MN bestand. Die 5'UTR (5' *untranslated region*) bezeichnet einen Bereich von etwa 300 Nukleotiden am 5'-Ende des Genoms. Bei Anwendung herkömmlicher Sequenzierungsmethoden kann es in dieser Region zur fehlerhaften Zuordnung von Nukleotiden kommen. Da dieser Bereich jedoch eine wichtige Rolle für die Replikation von Coronaviren spielt (Liu, P. et al. 2007, Yang & Leibowitz 2015), ist eine intakte 5'UTR Voraussetzung für die Herstellung rekombinanter Viren. Um ein Virus mit einer voll funktionsfähigen 5'UTR herstellen zu können, wurde im nächsten Schritt die exakte 5'UTR-Sequenz des zellkulturadaptierten Stammes CV777 mit Hilfe einer 5'-RACE-PCR (RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends*) bestimmt (2.2.4.6). Als Ausgangsmaterial für die Präparation viraler RNA dienten dabei mit CV777 infizierte Vero-Zellen (2.2.4.2). Anschließend wurde das 5'-Ende des Genoms mit Hilfe des FirstChoice® RLM-RACE Kits (Ambion) amplifiziert (2.2.4.6), in den pGEM-T Vektor ligiert und sequenziert. Im Folgenden wurde die 5'UTR<sub>MN</sub> in vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP durch die intakte 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenz ersetzt. Dafür erfolgte nach Infektion von CV-1-Zellen mit vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP die Transfektion mit Plasmid pGPT-Δ5'UTR, das entstehende vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP wurde in der darauffolgenden Positivselektion isoliert. Dieses diente als Ausgangsvirus für die Transfektion mit p5'UTR<sub>CV777</sub> und anschließender Negativselektion zur Isolierung rekombinanter Viren, welche die 5'UTR-Sequenz des Stammes CV777 beinhalten (vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP) (Abb. 22).



**Abb. 22: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP.** (A) Durch homologe Rekombination wurde die 5'UTR<sub>MN</sub> in vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt. Dieses wurde im nächsten Schritt durch die 5'UTR<sub>CV777</sub> substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau und Vacciniavirusgenom hellgrau dargestellt. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Darstellung des PCR-Produkts I im 1,5%igen Agarosegel (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

Für die Überprüfung des Effektes der 5'UTR auf die Herstellung rekombinanter PEDVs wurde nach Plaquereinigung und Amplifizierung des gesamten Genoms vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP-DNA im präparativen Maßstab hergestellt, im Restriktionsverdau mit *NotI* geschnitten, *in-vitro*-transkribiert und die resultierende RNA (Abb. 23A) in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert. Der geerntete Zellkulturüberstand wurde zur Infektion von Vero-Zellen verwendet. Bereits 24 Stunden nach der Infektion konnten im Fluoreszenzmikroskop GFP-exprimierende Zellen identifiziert werden (Abb. 23B). Außerdem entwickelte sich ein deutlicher zytopathischer Effekt nach Trypsinzugabe.



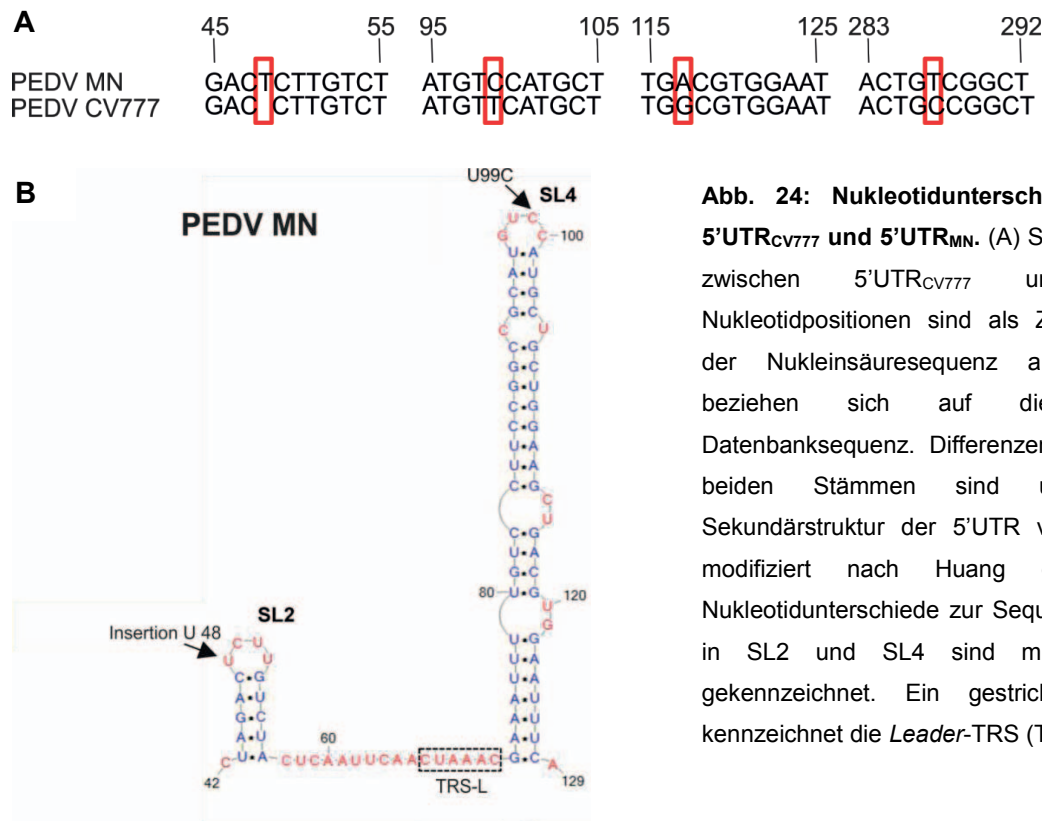
**Abb. 23: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP.** (A) Je 1,5 µl vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP-DNA vor und nach *NotI*-Restriktionverdau wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die *in-vitro*-transkribierte RNA wurde auf einem 1,2%igen Agarosegel dokumentiert. (B) Der schematische Genomaufbau von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP und die GFP-Expression in infizierten Vero-Zellen ist abgebildet. ORFs von PEDV MN sind weiß, solche von PEDV CV777 grau und GFP schwarz dargestellt.

Eine RNA-Präparation aus infizierten Zellen mit nachfolgender RT-PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte die Identität von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Herstellung rekombinanter PEDVs durch den Austausch der 5'UTR<sub>MN</sub> gegen die 5'UTR<sub>CV777</sub> in Kombination mit dem S-Gen des zellkulturadaptierten Stammes CV777 ermöglicht wurde.

### 3.3.2 Identifizierung von Nukleotiden in der 5'UTR, welche für eine erfolgreiche Herstellung rekombinanter PEDVs essentiell sind

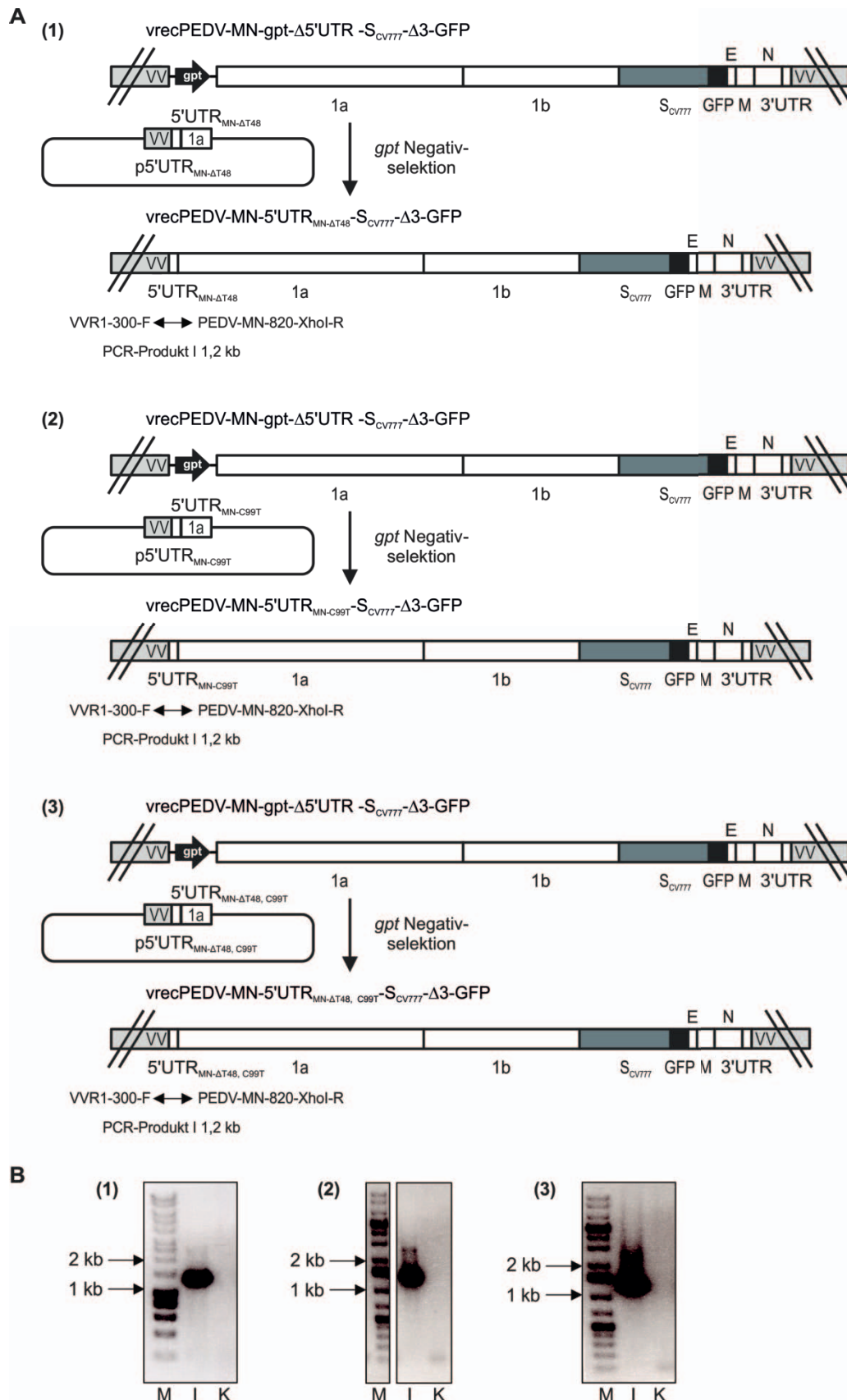
Zur weiteren Untersuchung der 5'UTRs der Stämme CV777 und MN wurden Sequenzvergleiche durchgeführt, welche vier Nukleotidunterschiede zeigten. Diese bestanden in einer Insertion (U) an Nukleotidposition 48 in der 5'UTR<sub>MN</sub> sowie in 3 Änderungen der MN-Sequenz im Vergleich zur 5'UTR<sub>CV777</sub> (U99C, G117A und C287U) (Abb. 24A). Vorhersagen der RNA-Struktur der 5'UTR von PEDV deuteten darauf hin, dass zwei der vier Nukleotidunterschiede an der Spitze von *Stemloop* 2 (SL2, Insertion U 48) bzw. *Stemloop* 4 (SL4, U99C) lokalisierten (Huang et al. 2013) (Abb. 24B).





**Abb. 24: Nukleotidunterschiede zwischen 5'UTR<sub>CV777</sub> und 5'UTR<sub>MN</sub>.** (A) Sequenzvergleich zwischen 5'UTR<sub>CV777</sub> und 5'UTR<sub>MN</sub>. Nukleotidpositionen sind als Zahlen oberhalb der Nukleinsäuresequenz angegeben und beziehen sich auf die PEDV-MN-Datenbanksequenz. Differenzen zwischen den beiden Stämmen sind umrandet. (B) Sekundärstruktur der 5'UTR von PEDV MN, modifiziert nach Huang et al. 2013. Nukleotidunterschiede zur Sequenz von CV777 in SL2 und SL4 sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ein gestrichelter Rahmen kennzeichnet die *Leader-TRS* (TRS-L).

Die Bedeutung konservierter RNA-Strukturen am 5'- und 3'-Ende coronaviraler Genome für Replikation, Transkription und Translation ist bekannt (Yang & Leibowitz 2015). Die Anzahl der am Aufbau der *Stemloops* beteiligten Nukleotide sowie deren Sequenzkonservierung sind essentiell für Replikation und Transkription (Madhugiri et al. 2018). Da U48 und U99C an der Spitze von SL2 und SL4 liegen, ist anzunehmen, dass diese Nukleotide an wichtigen Interaktionen (RNA-RNA/RNA-Protein) beteiligt und dadurch für das Virus essentiell sind. Da die Modifikationen G117A und C287U laut Vorhersage keinen Einfluss auf die RNA-Struktur hatten und nicht an der Spitze von *Stemloops* positioniert waren, wurden im Folgenden nur die Differenzen an Position 48 sowie 99 näher untersucht. Zu diesem Zwecke wurden drei weitere rekombinante Vacciniaviren hergestellt (Abb. 25): (a) vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP, in welchem das T an Position 48 deletiert wurde (Abb. 25A1), (b) vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP mit Substitution des C an Position 99 durch T (C99T) (Abb. 25A2) und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP, welches beide Modifikationen beinhaltet (Abb. 25A3). Dazu wurden CV-1-Zellen mit vrecPEDV-MN-gpt-Δ5'UTR-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP infiziert und mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Zur Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP wurde p5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub> verwendet, zur Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP wurde p5'UTR<sub>MN-C99T</sub> eingesetzt und nach Transfektion mit p5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub> entstand vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP. Alle drei Viren wurden in einer Negativselektion isoliert und der Selektionserfolg konnte durch Amplifikation der 5'UTR und angrenzender Regionen gezeigt werden (Abb. 25B).

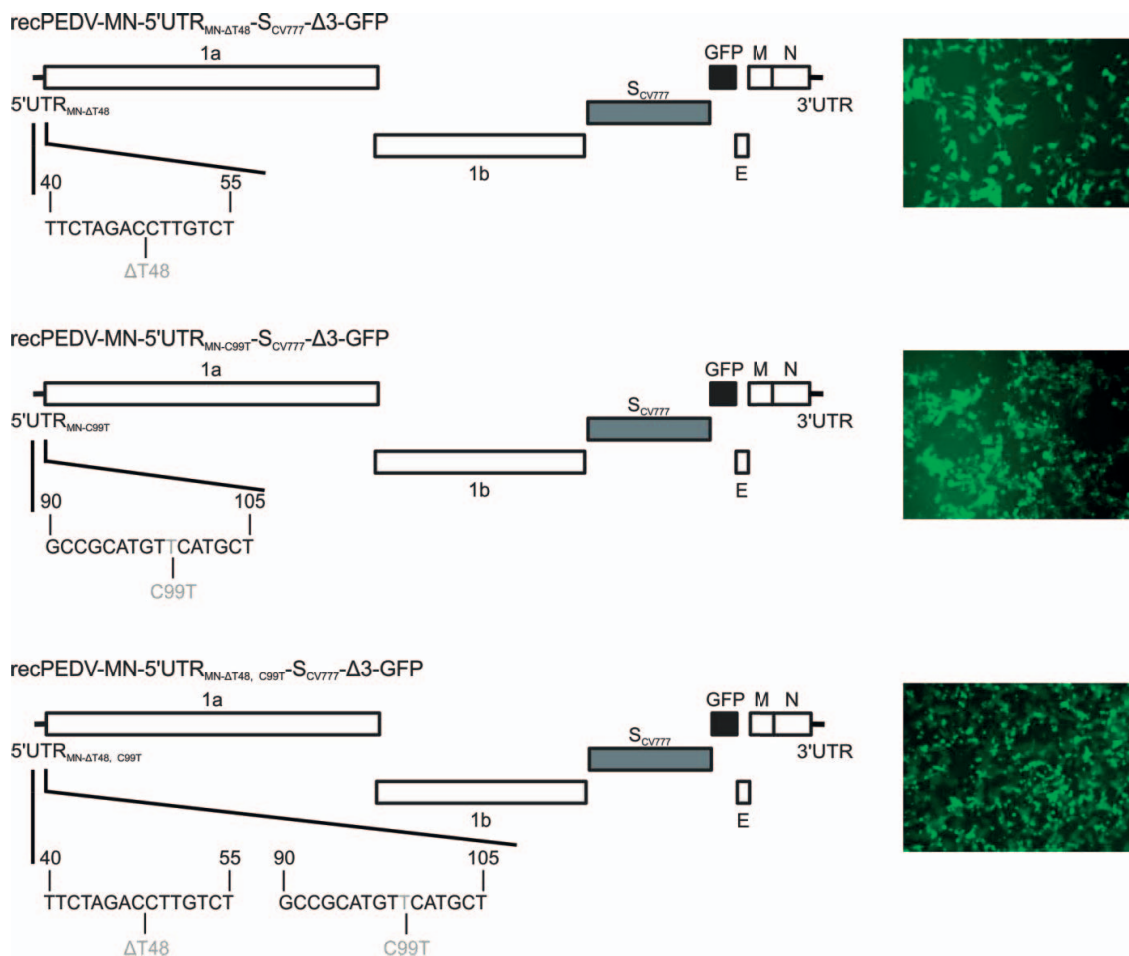


**Abb. 25: Generierung von vrecPEDVs mit Mutationen in der 5'UTR.** (A) Durch homologe Rekombination wurde das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) in vrecPEDV-MN-gpt- $\Delta$ 5'UTR- $S_{CV777}$ - $\Delta$ 3-GFP durch die 5'UTR<sub>MN</sub> mit Deletion von T an Position 48 ( $\Delta$ T48) ersetzt und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>- $S_{CV777}$ - $\Delta$ 3-GFP (1) hergestellt. Die



Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP mit Substitution von C an Position 99 durch T (C99T) (2) und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP mit beiden Mutationen (ΔT48, C99T) (3) ist ebenfalls dargestellt. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau und Vacciniavirusgenom hellgrau dargestellt. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektionen sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Die PCR-Produkte zur Überprüfung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP (1), vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP (2) und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP (3) wurde im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

Anschließend wurden die Viren plaquegereinigt und für eine DNA-Isolierung im präparativen Maßstab auf BHK-Zellen angezüchtet. Nach *In-vitro*-Transkription der *NotI*-verdauten DNA und anschließender Elektroporation in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen wurde der Überstand nach 48 Stunden geerntet und für die Infektion von Vero-Zellen verwendet. In diesen konnte 24 Stunden p.i. GFP-Expression (Abb. 26) sowie 48 Stunden p.i. ein zytopathischer Effekt nach Trypsinzugabe nachgewiesen werden. Zudem wurde die Identität aller drei Viren (recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP, recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP und recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP) durch RNA-Präparation aus infizierten Zellen mit nachfolgender Sequenzierung des PCR-Produktes nach Amplifikation der 5'UTR bestätigt.



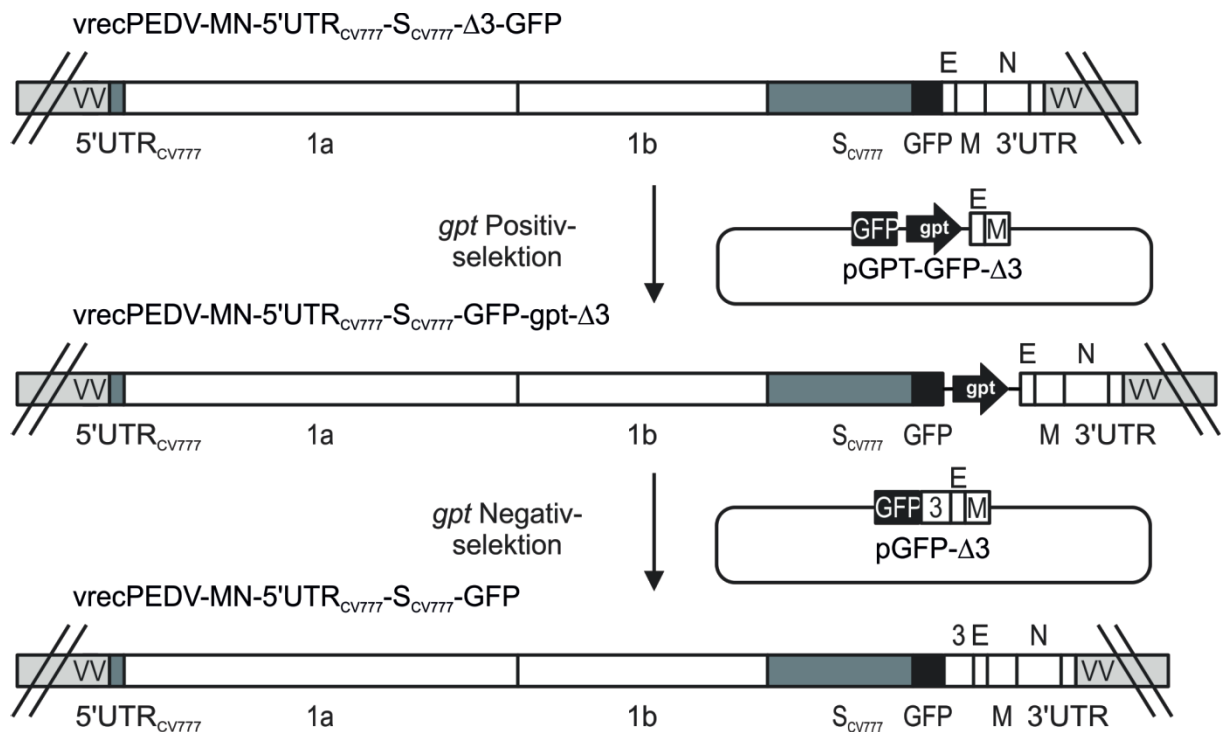
**Abb. 26: Schematische Darstellung von recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP, recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP und recPEDV-MN-5'UTR<sub>MN-ΔT48, C99T</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP. ORFs von PEDV MN sind weiß, solche**

von PEDV CV777 grau und GFP schwarz dargestellt. Der Bereich mit Mutationen in der 5'UTR (hellgrau) ist vergrößert abgebildet, Zahlen oberhalb der Sequenzen geben die zugehörigen Nukleotidpositionen mit Bezug zur PEDV-MN-Datenbanksequenz an. Auf der rechten Seite ist die GFP-Expression in Vero-Zellen nach Infektion mit dem jeweiligen Virus dargestellt (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35, Zeiss).

Im Weiteren wurde eine Wachstumskurve der rekombinanten PEDVs angefertigt (2.2.5.1.2), welche sehr ähnliche Wachstumseigenschaften für alle Viren zeigte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung konservierter RNA-Strukturen im Bereich der 5'UTR für die Replikation von Coronaviren, da bereits die Deletion bzw. der Austausch nur eines Nukleotides in SL2 oder SL4 einen erfolgreichen *Rescue* rekombinanter PEDVs ermöglichten. Für die weitere Herstellung rekombinanter Viren im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenz beibehalten.

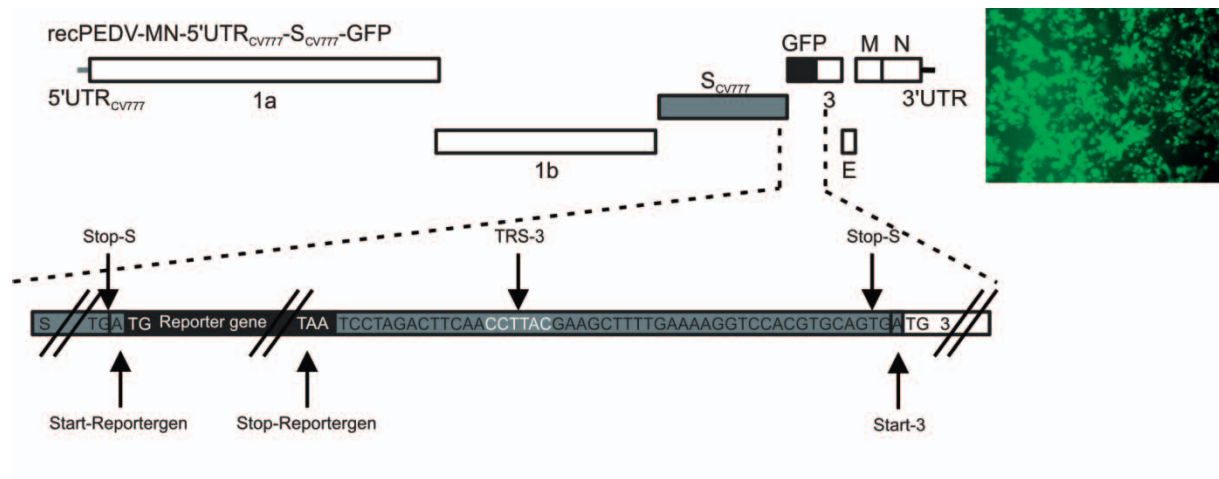
### 3.4 Untersuchung des Einflusses von ORF3 auf den *Rescue* rekombinanter PEDVs

Wie bereits in Kapitel 3.2 zur Herstellung von vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP beschrieben, war es in einer 2015 veröffentlichten Studie nicht möglich, ein rekombinantes PEDV mit intaktem Gen 3 von einem cDNA-Klon ausgehend herzustellen (Jengarn et al. 2015). Als Ursache für den erfolglosen *Rescue* vermuteten Jengarn et al. einen hemmenden Effekt von Gen 3 auf die Replikation von PEDV *in vitro*. Zur näheren Untersuchung dieser Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit ein rekombinantes Vacciniavirus, welches neben 5'UTR und S-Gen des Stammes CV777 ein intaktes Gen 3<sub>MN</sub> *downstream* des GFP-Gens besitzt, hergestellt (vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP) (Abb. 27). Dafür wurden im ersten Schritt mit vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP infizierte CV-1-Zellen mit dem Plasmid pGPT-GFPΔ3 transfiziert. Das resultierende Virus vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP-gpt-Δ3 wurde in einer Positivselektion isoliert (Abb. 27). Durch homologe Rekombination mit pGFP-3 wurde ein intaktes Gen 3 in die PEDV-cDNA eingeführt. In der darauffolgenden Negativselektion entstand vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP (Abb. 27).



**Abb. 27: Herstellung von *vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP*.** Durch homologe Rekombination wurde das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) in *vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP* zwischen GFP und E-Gen integriert. Anschließend wurde das *gpt*-Gen durch Gen 3 ersetzt und somit ein intakter ORF3 in *vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP* eingeführt. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt.

Dieses wurde plaquegereinigt und anschließend auf BHK-21-Zellen vermehrt um Vacciniavirus-DNA in ausreichender Menge herzustellen. Nach anschließendem *NotI*-Restriktionsverdau und *In-vitro*-Transkription wurde *recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP*-RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert. Der Elektroporationsüberstand wurde daraufhin für die Infektion von Vero-Zellen verwendet. Diese zeigten 24 Stunden p.i. Grünfluoreszenz (Abb. 28) und Synzytienbildung nach Trypsinzugabe. Eine RT-PCR von infizierten Zellen mit nachfolgender Sequenzierung bestätigte den erfolgreichen *Rescue* von *recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-GFP*. Eine im Anschluss durchgeführte Wachstumskinetik des rekombinanten PEDV zeigte sehr ähnliche Wachstumseigenschaften mit *recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP*. Somit konnte kein hemmender Einfluss von Gen 3 auf die Herstellung rekombinanter PEDVs nachgewiesen werden.



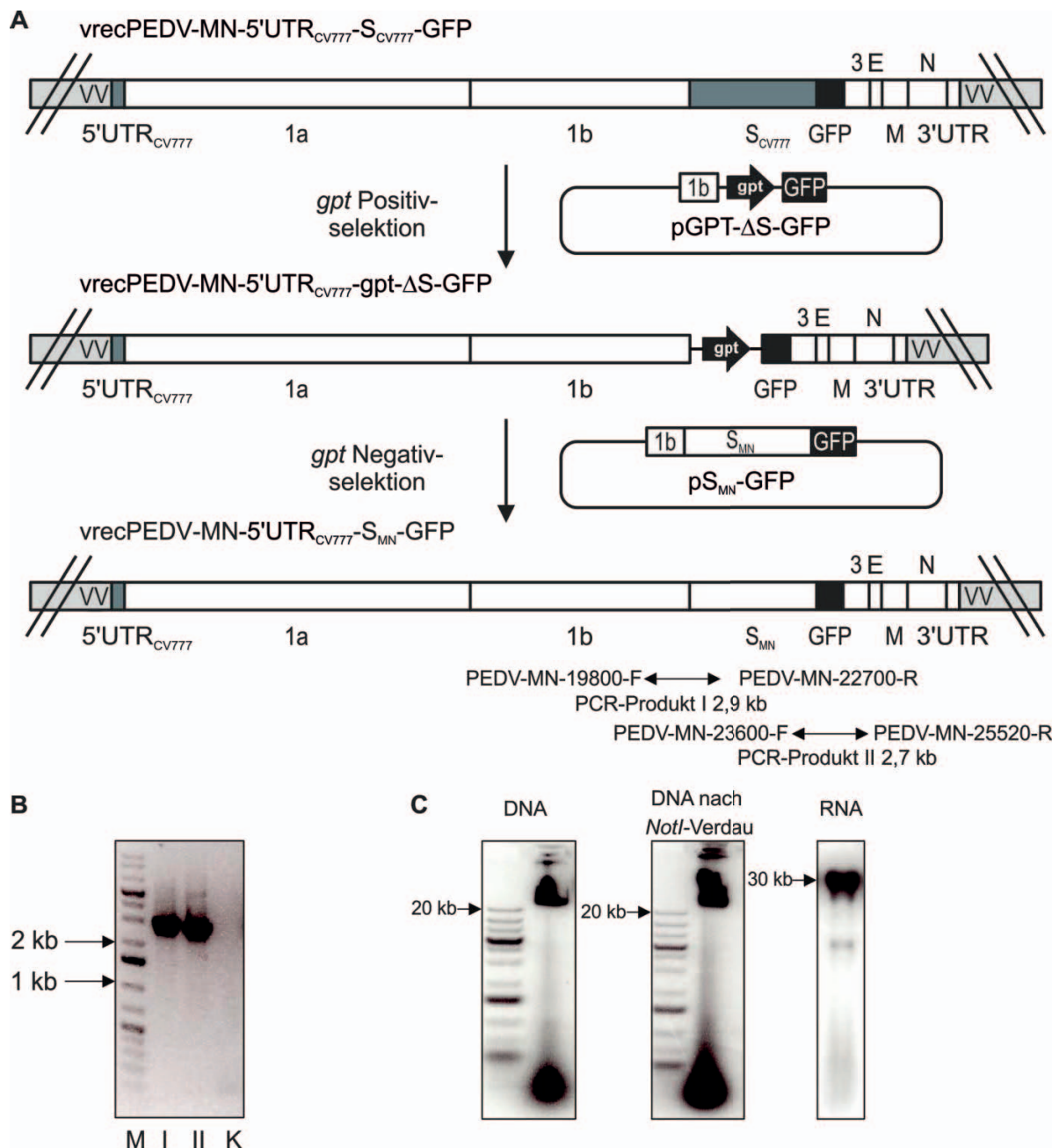
**Abb. 28: Herstellung von  $\text{recPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}\text{-GFP}$ .** Schematische Abbildung der Genomorganisation; ORFs von PEDV MN sind weiß, ORFs von PEDV CV777 grau und GFP schwarz dargestellt. Die Insertionsstelle des GFP-Reportergens inklusive Start- und Stop-Codons ist vergrößert abgebildet. Um die Expression von Gen 3 zu gewährleisten, wurden *downstream* des GFP-Gens zusätzlich die letzten 49 Nukleotide des S-Gens, welche die TRS (Transkriptions-regulierende Sequenz) für ORF3 enthalten, eingefügt. Auf der rechten Seite ist die GFP-Expression in Vero-Zellen nach Infektion mit  $\text{recPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}\text{-GFP}$  abgebildet (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35, Zeiss).

Im Rahmen der Zellkulturadaptation von PEDVs wurde häufig eine Deletion in ORF3 beobachtet, die in der Bildung eines trunkierten Genproduktes resultiert (Park, S. J. et al. 2008). Um die Stabilität von ORF3 während Zellkulturpropagation von PEDV zu untersuchen, wurde  $\text{recPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}\text{-GFP}$  im Folgenden über 6 Passagen auf Vero-Zellen vermehrt. Aus Zellen der zweiten und fünften Passage wurde RNA isoliert und Gen 3 in einer darauffolgenden RT-PCR amplifiziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte die Vollständigkeit von ORF3 nach zwei Zellkulturpassagen. Bereits nach fünf Passagen waren jedoch Deletionen aufgetreten, die eine vollständige Expression von ORF3 verhinderten. Das Auftreten von Veränderungen in diesem Bereich ohne Vitalitätsverlust spricht für eine vernachlässigbare Funktion von Gen 3 *in vitro* und ist in der Literatur bekannt (Park, S. J. et al. 2008, Wang, K. et al. 2012).

### 3.5 Einfluss von $\text{S}_{\text{MN}}$ auf die Herstellung und *In-vitro*-Kultivierung rekombinanter PEDVs

Da die Funktionsfähigkeit des cDNA-Klons nach Korrektur der 5'UTR-Sequenz gezeigt werden konnte (3.3 und 3.4), sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Herstellung rekombinanter Viren mit der Datenbanksequenz des  $\text{S}_{\text{MN}}$ -Gens möglich ist. Dazu wurde  $\text{S}_{\text{CV777}}$  durch  $\text{S}_{\text{MN}}$  ersetzt. Als Ausgangsvirus für die homologe Rekombination wurde hierfür  $\text{recPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}\text{-GFP}$  gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass Gen 3 keinen Einfluss auf den *Rescue* von recPEDVs hat (3.4) und die Substitution der  $\text{5'UTR}_{\text{MN}}$

durch die entsprechende Sequenz von CV777 den *Rescue* rekombinanter PEDVs mit  $S_{CV777}$  ermöglichte (3.3). Nach Transfektion mit pGPT- $\Delta S$ -GFP wurde vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-gpt- $\Delta S$ -GFP auf CV-1-Zellen isoliert und nach Überprüfung des Selektionserfolges mit pS<sub>MN</sub>-GFP transfiziert (Abb. 29A). Das nach Negativselektion entstandene vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-GFP (Abb. 29A und B) wurde nach Vollständigkeitskontrolle plaquegereinigt und für die Infektion von BHK-21-Zellen verwendet. Die aus diesen Zellen isolierte DNA wurde mit *NotI*-Enzym verdaut, *in-vitro*-transkribiert und die entstandene RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen transfiziert (Abb. 29C).



**Abb. 29: Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-GFP.** (A) Durch Transfektion mit pGPT- $\Delta S$ -GFP wurde das  $S_{CV777}$ -Gen in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>- $S_{CV777}$ -GFP durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt.

Dieses wurde anschließend durch homologe Rekombination durch  $S_{MN}$  substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau und Vacciniavirusgenom hellgrau dargestellt. Das GFP-Gen ist schwarz abgebildet. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Die PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus). (C) Zur Überprüfung der Qualität wurden je 1,5 µl DNA vor und nach *NotI*-Verdau auf einem 1,5%igen Agarosegel dokumentiert. Die *in-vitro*-transkribierte RNA wurde auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen.

Dennoch konnte nach Infektion von Vero-Zellen mit Elektroporationsüberstand und Trypsinzugabe weder eine GFP-Expression noch ein zytopathischer Effekt nachgewiesen werden. Auch durch weitere Passagierung des Überstandes in Zellkultur konnten keine rekombinanten Viren isoliert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Herstellung rekombinanter PEDVs unter Verwendung des S-Gens der Datenbanksequenz von Stamm MN nicht möglich war.

### **3.6 Herstellung rekombinanter PEDVs mit $S_{MN}$ durch Einführung spezifischer Mutationen**

#### **3.6.1 Aminosäuredifferenzen zwischen $S_{MN}$ und dem S-Protein *in-vitro*-kultivierbarer Feldstämme**

Da eine erfolgreiche Herstellung rekombinanter PEDVs mit  $S_{MN}$  nicht möglich war (3.5), wurden im Folgenden Aminosäuren identifiziert, die für die *In-vitro*-Kultivierung des Virus unerlässlich sind. Dazu wurde die S-Proteinsequenz des Stammes MN mit der von zwei hochvirulenten, *in-vitro*-kultivierbaren Stämmen verglichen. Der Stamm NPL2013 (GenBank Akzessionsnummer KM052365) war aus Ferkeln mit deutlichen Anzeichen von PED isoliert worden und konnte erfolgreich auf Vero-Zellen vermehrt werden (Collin et al. 2015, Lawrence et al. 2014). Der Stamm PC22A (GenBank Akzessionsnummer KM392224) wurde aus Tieren mit klinischer PED gewonnen, an Zellkultur adaptiert (Oka et al. 2014) und stellte sich hochvirulent dar (Liu, X. et al. 2015). Des Weiteren wurde ein revers-genetisches System für den Stamm PC22A etabliert (Beall et al. 2016). Die Analyse der S-Proteinsequenz mit dem Programm „BioEdit“ (2.2.3.4.3) zeigte 5 bzw. 4 Aminosäureunterschiede in der S1-Domäne von  $S_{MN}$  im Vergleich zu  $S_{PC22A}$  und  $S_{NPL2013}$ . Drei dieser Differenzen waren an exakt derselben Aminosäureposition in allen 3 Sequenzen lokalisiert (Abb. 30). Dabei enthält  $S_{MN}$  an Position 226 die Aminosäure Phenylalanin, wogegen sowohl  $S_{NPL2013}$  als auch  $S_{PC22A}$  an dieser Stelle Serin besitzen. An Position 375 ist in  $S_{MN}$  die Aminosäure Leucin zu finden, während die anderen beiden Stämme dort ein Phenylalanin kodieren. Die dritte Position (486) war in allen drei Stämmen unterschiedlich besetzt,  $S_{MN}$  enthält dort Histidin,  $S_{NPL2013}$  Threonin und  $S_{PC22A}$  Prolin.

	221	230	371	380	481	490
S <sub>MN</sub>	GEDGIFYQPC		YYCFLKVDY		DDGFYHISSR	
S <sub>NPL2013</sub>	GEDGISYQPC		YYCFFKVDY		DDGFYTISSR	
S <sub>PC22A</sub>	GEDGISYQPC		YYCFFKVDY		DDGFYPISSR	
	*		*		*	

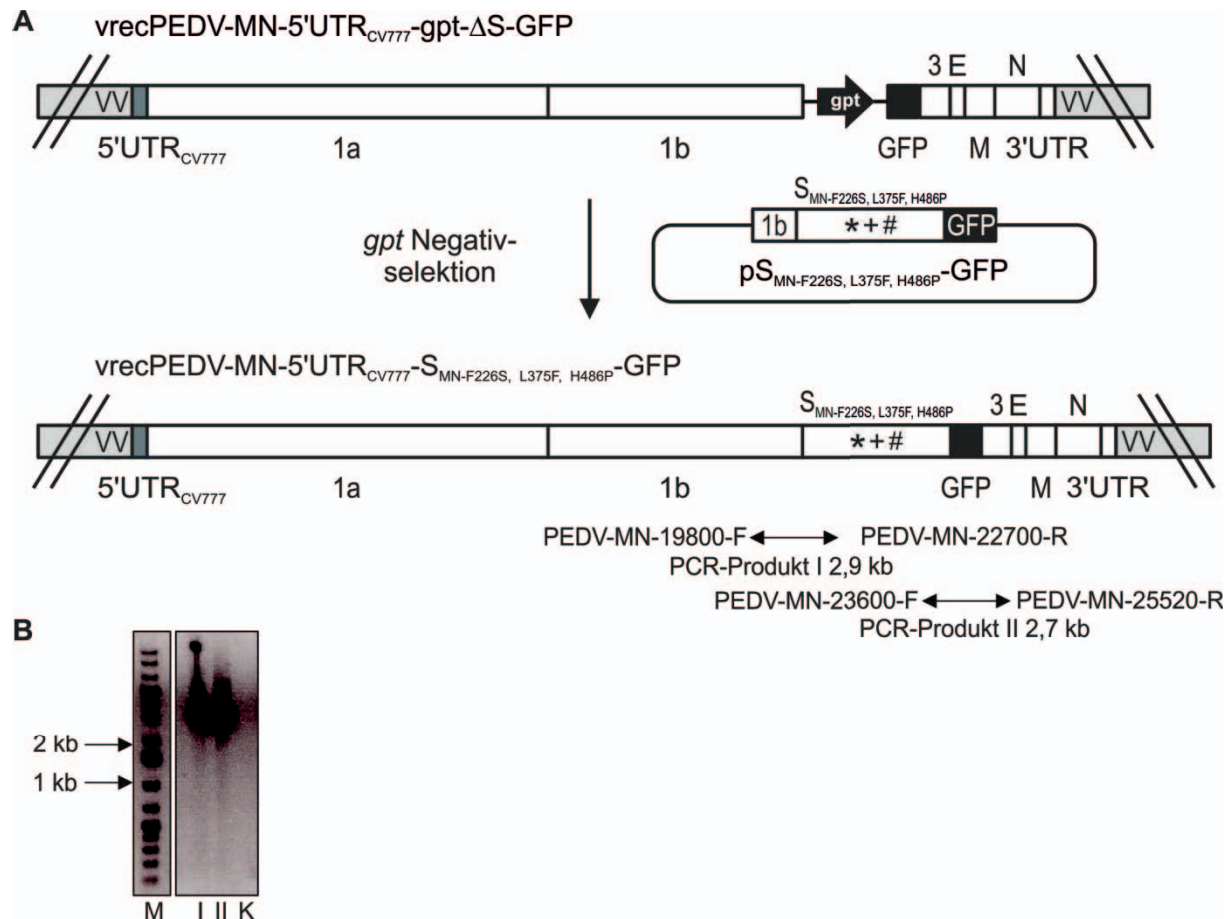
**Abb. 30: Vergleich der Aminosäuresequenz des S-Proteins der Stämme MN, NPL2013 und PC22A an Positionen 221-230, 371-380 und 481-490.** Aminosäurepositionen, die in S<sub>MN</sub> mit anderen Aminosäuren besetzt sind als in S<sub>NPL2013</sub> und S<sub>PC22A</sub>, sind mit Sternen gekennzeichnet. Die von der S<sub>MN</sub>-Sequenz abweichenden Aminosäuren sind grau dargestellt. Die angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die S<sub>MN</sub>-Proteinsequenz.

Da die S1-Untereinheit für die Bindung des S-Proteins an den Rezeptor bzw. eventuelle Korezeptoren (z. B. Sialinsäuren) verantwortlich ist (1.1.2 und 1.2.3.1), liegt es nahe dass sich Änderungen der Aminosäuresequenz in diesem Bereich auf die Kultivierbarkeit der Viren auswirken. Im nächsten Schritt sollte daher überprüft werden, ob die drei oben beschriebenen Änderungen eine *In-vitro*-Kultivierung von recPEDVs auf Basis von S<sub>MN</sub> ermöglichen.

### 3.6.2 Identifizierung von Aminosäuren im S-Protein mit Einfluss auf einen erfolgreichen *Rescue* und die *In-vitro*-Kultivierung rekombinanter PEDVs

Zur Untersuchung des Einflusses der Aminosäuren an Position 226, 375 und 486 des S-Proteins auf die Herstellung/*In-vitro*-Kultivierbarkeit rekombinanter PEDVs wurden im Folgenden alle drei benannten Aminosäuren in S<sub>MN</sub> durch die entsprechenden Residuen von S<sub>PC22A</sub> ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pS<sub>MN</sub>-GFP durch ortsgerichtete Mutagenese (2.2.3.1.2) so verändert, dass an Position 226 des S-Proteins Serin (F226S), an Position 375 Phenylalanin (L375F), sowie an Position 486 Prolin (H486P) kodierten. Das resultierende Plasmid pS<sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub>-GFP wurde anschließend in mit vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-gpt-ΔS-GFP infizierte Zellen transfiziert. In der darauffolgenden Negativselektion wurde vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub>-GFP isoliert (Abb. 31).

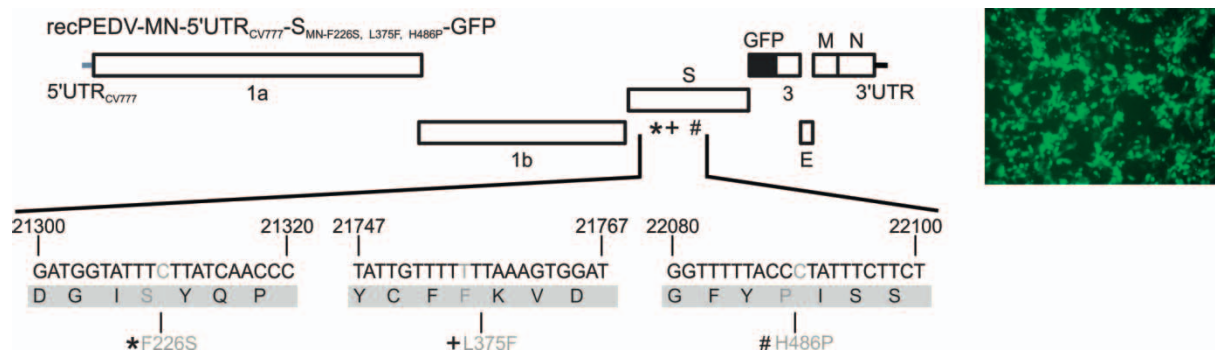




**Abb. 31: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub>-GFP.** (A) Durch homologe Rekombination wurde das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-gpt-ΔS-GFP durch das S<sub>MN</sub>-Gen mit den Mutationen F226S (\*), L375F (+) und H486P (#) ersetzt. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Die PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

Nach Vollständigkeitskontrolle der PEDV-cDNA und DNA-Präparation in ausreichender Menge folgte ein Restriktionsverdau mit *NotI* und anschließender *In-vitro*-Transkription. Der geerntete Überstand nach Elektroporation von BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-F226S, L375F, H486P</sub>-GFP-RNA wurde für die Infektion von Vero-Zellen verwendet. 24 Stunden p.i. konnte Grünfluoreszenz (Abb. 32) der infizierten Zellen sowie Synzytiumformation nach Trypsinzugabe beobachtet werden.





**Abb. 32: Rescue von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-F226S, L375F, H486P-GFP.** Auf der linken Seite ist die Genomorganisation von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-F226S, L375F, H486P-GFP schematisch dargestellt. ORFs von PEDV MN sind weiß, solche von PEDV CV777 grau und GFP schwarz abgebildet. Ein Stern symbolisiert die eingeführte Modifikation an Position 226 zur Umwandlung von Phenylalanin in Serin. Ein Pluszeichen zeigt die Substitution von Leucin an Position 375 durch Phenylalanin an und eine Raute signalisiert den Ersatz von Histidin an Position 486 durch Prolin. Die entsprechenden Regionen sind auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (grau hinterlegt) vergrößert abgebildet. Positionsangaben beziehen sich auf die PEDV-MN-Datenbanksequenz. Auf der rechten Seite ist die GFP-Expression in Vero-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-F226S, L375F, H486P-GFP dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein erfolgreicher *Rescue* und die *In-vitro*-Kultivierung rekombinanter PEDVs mit S<sub>MN</sub> durch Modifikation dreier Aminosäuren ermöglicht wurde.

### 3.6.3 Exakte Bestimmung der für *Rescue/In-vitro*-Kultivierung von recPEDVs essentiellen Aminosäuren

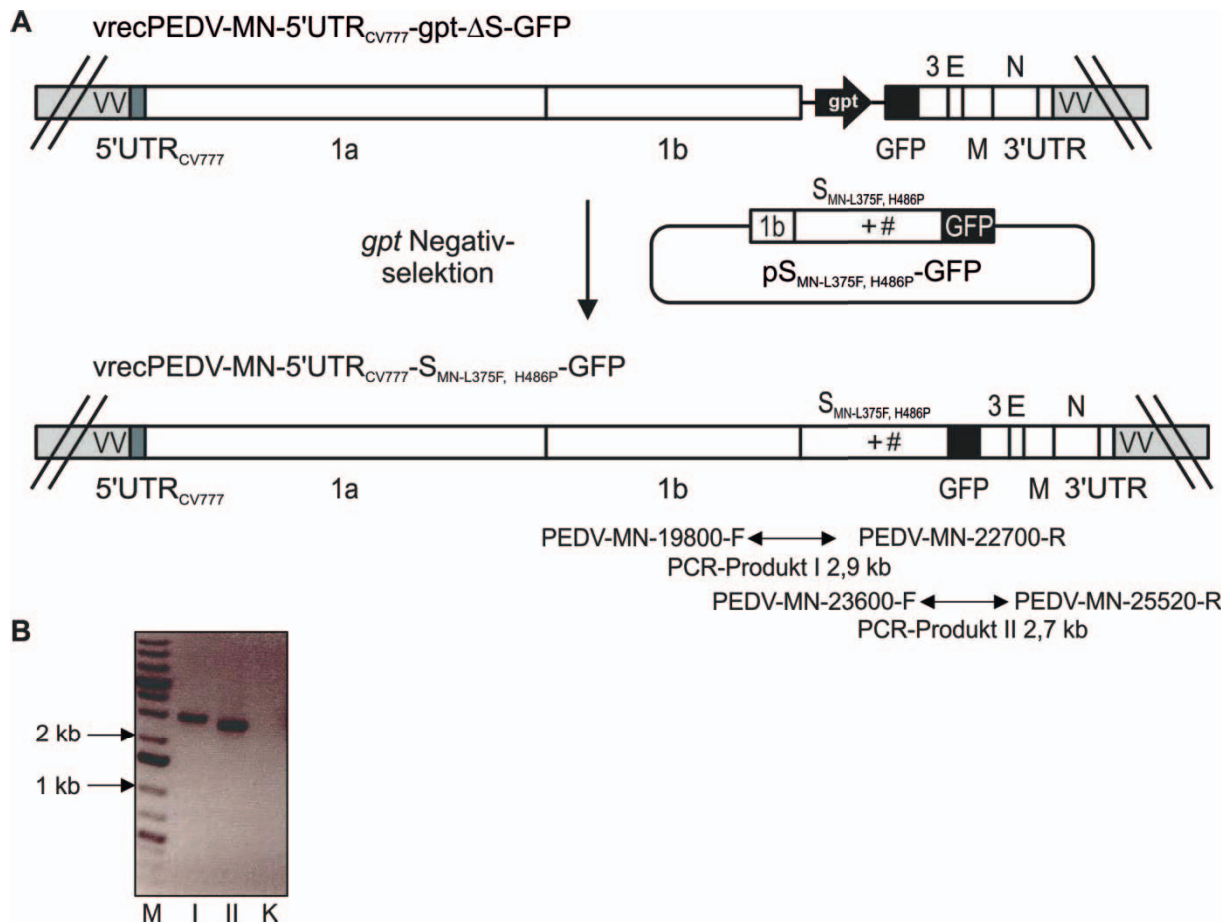
Zur Identifizierung der exakten Aminosäuren, die für ein *In-vitro*-Wachstum rekombinanter Viren verantwortlich sind, wurden im nächsten Schritt mehrere vrecPEDVs hergestellt (Tab. 4).

vrecPEDV	Mutationen in S <sub>MN</sub>			Negativselektions-plasmid	recPEDV
	F226S	L375F	H486P		
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -F226S, H486P-GFP	+		+	pS <sub>MN</sub> -F226S, H486P-GFP	X
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -F226S, L375F-GFP	+	+		pS <sub>MN</sub> -F226S, L375F-GFP	✓
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -L375F, H486P-GFP		+	+	pS <sub>MN</sub> -L375F, H486P-GFP	✓
vrecPEDV-MN-5'UTR <sub>CV777</sub> -S <sub>MN</sub> -L375F-GFP		+		pS <sub>MN</sub> -L375F-GFP	X

**Tab. 4: Herstellung von vrecPEDVs mit Mutationen in S<sub>MN</sub>.** Die zur Herstellung der vrecPEDVs verwendeten Negativselektionsplasmide und in S<sub>MN</sub> eingeführten Mutationen sind dargestellt. Die rechte Spalte zeigt an, welche der Mutationen zu einem erfolgreichen *Rescue* der entsprechenden recPEDVs führten.

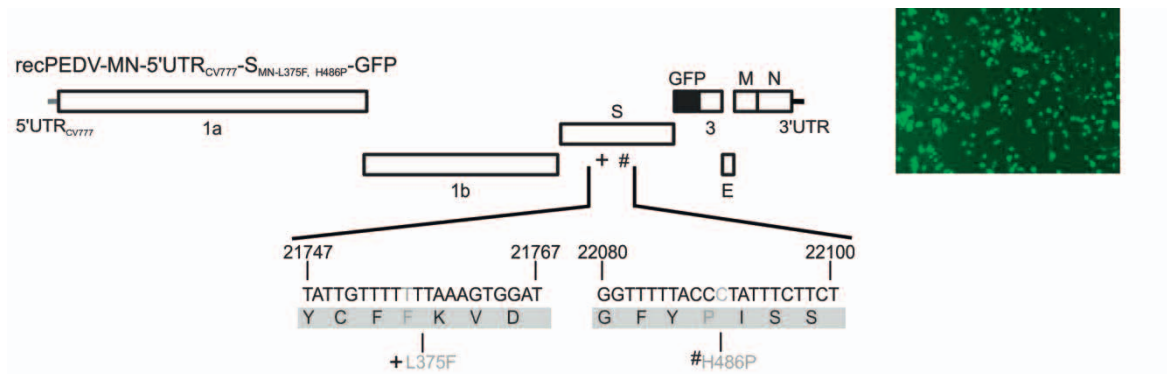
Die Herstellung dieser rekombinanten Viren wird beispielhaft anhand von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-L375F, H486P-GFP gezeigt (Abb. 33). Zu diesem Zweck wurden CV-1-Zellen mit vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-gpt-ΔS-GFP infiziert und anschließend mit dem Plasmid pS<sub>MN</sub>-L375F, H486P-GFP transfiziert. Die darauffolgende Negativselektion ergab vrecPEDV-MN-

5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP, welches im S<sub>MN</sub>-Gen nur die Mutationen Leucin zu Phenylalanin an Position 375 und Histidin zu Prolin an Position 486 trägt.



**Abb. 33: Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP.** (A) Durch homologe Rekombination wurde das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-gpt-ΔS-GFP durch das S<sub>MN</sub>-Gen mit nur zwei Aminosäuremutationen (L375F (+) und H486P (#)) ersetzt. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile markiert. (B) Die zugehörigen PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

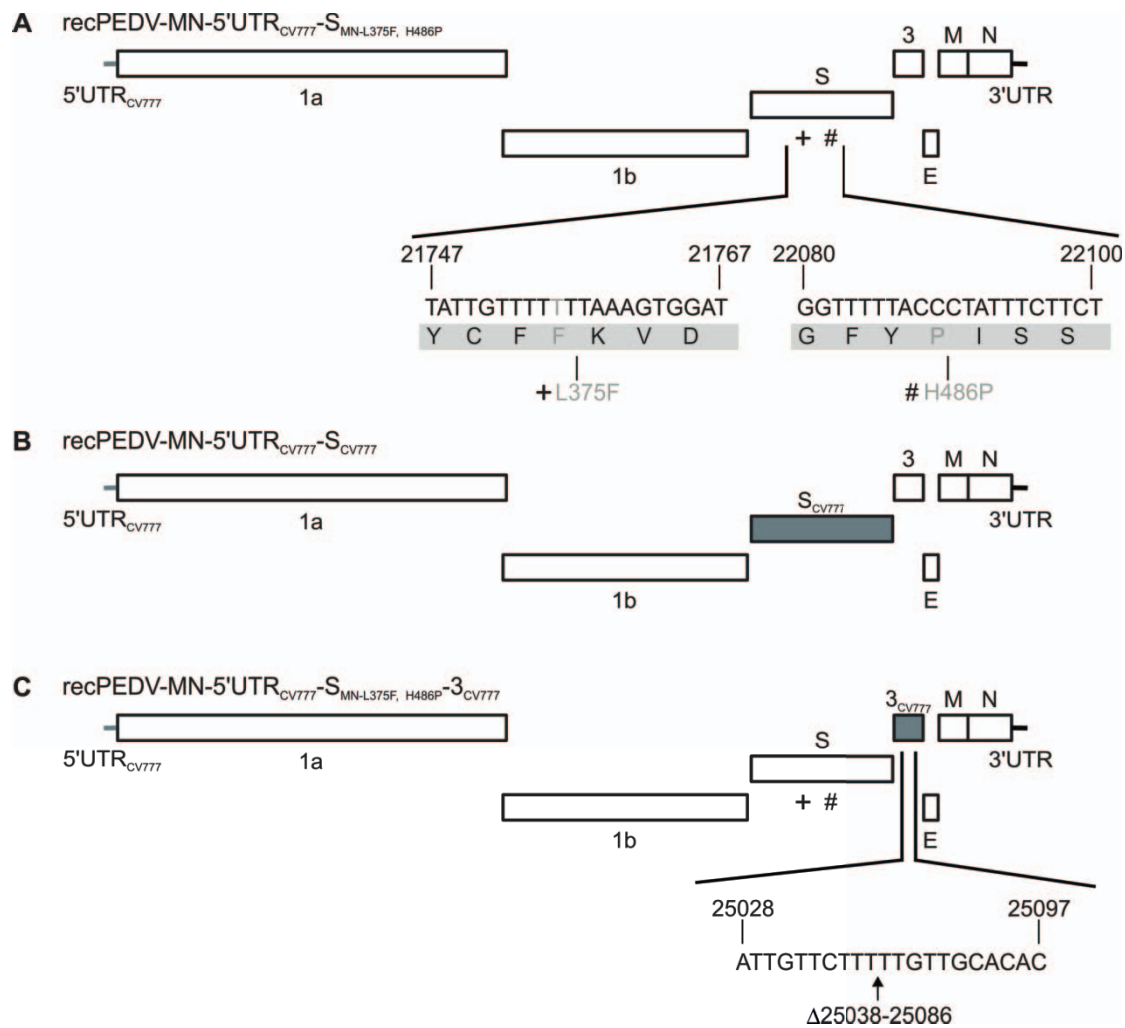
Nach Elektroporation von *in-vitro*-transkribierter recPEDV-RNA (Tab. 4) konnten nur recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-F226S, L375F</sub>-GFP erfolgreich hergestellt und auf Vero-Zellen propagiert werden (Abb. 34). Die Identität der Viren wurde durch Sequenzierung bestätigt. Somit wurde gezeigt, dass zwei Mutationskombinationen (F226S+L375F oder L375F+H486P) in S<sub>MN</sub> einen erfolgreichen *Rescue* und Zellkulturpropagation rekombinanter PEDVs ermöglichten. Allerdings erreichte recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP deutlich höhere Virustiter, sodass die Mutationen L375F und H486P im Weiteren beibehalten wurden, um rekombinante PEDVs auf Basis der MN-Datenbanksequenz für *In-vivo*-Experimente zu generieren.



**Abb. 34: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP.** Schematische Darstellung der Genomorganisation von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP. ORFs von PEDV MN sind weiß, ORFs von PEDV CV777 grau und GFP schwarz abgebildet. Ein Pluszeichen bzw. eine Raute zeigen die Substitution von Leucin an Position 375 durch Phenylalanin bzw. von Histidin an Position 486 durch Prolin an. Die entsprechenden Regionen sind auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (grau hinterlegt) vergrößert abgebildet. Positionsangaben beziehen sich auf die PEDV-MN-Datenbanksequenz. Auf der rechten Seite ist die GFP-Expression in mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP infizierten Vero-Zellen 24 Stunden p.i. gezeigt.

### 3.7 Herstellung rekombinanter PEDVs für *In-vivo*-Experimente

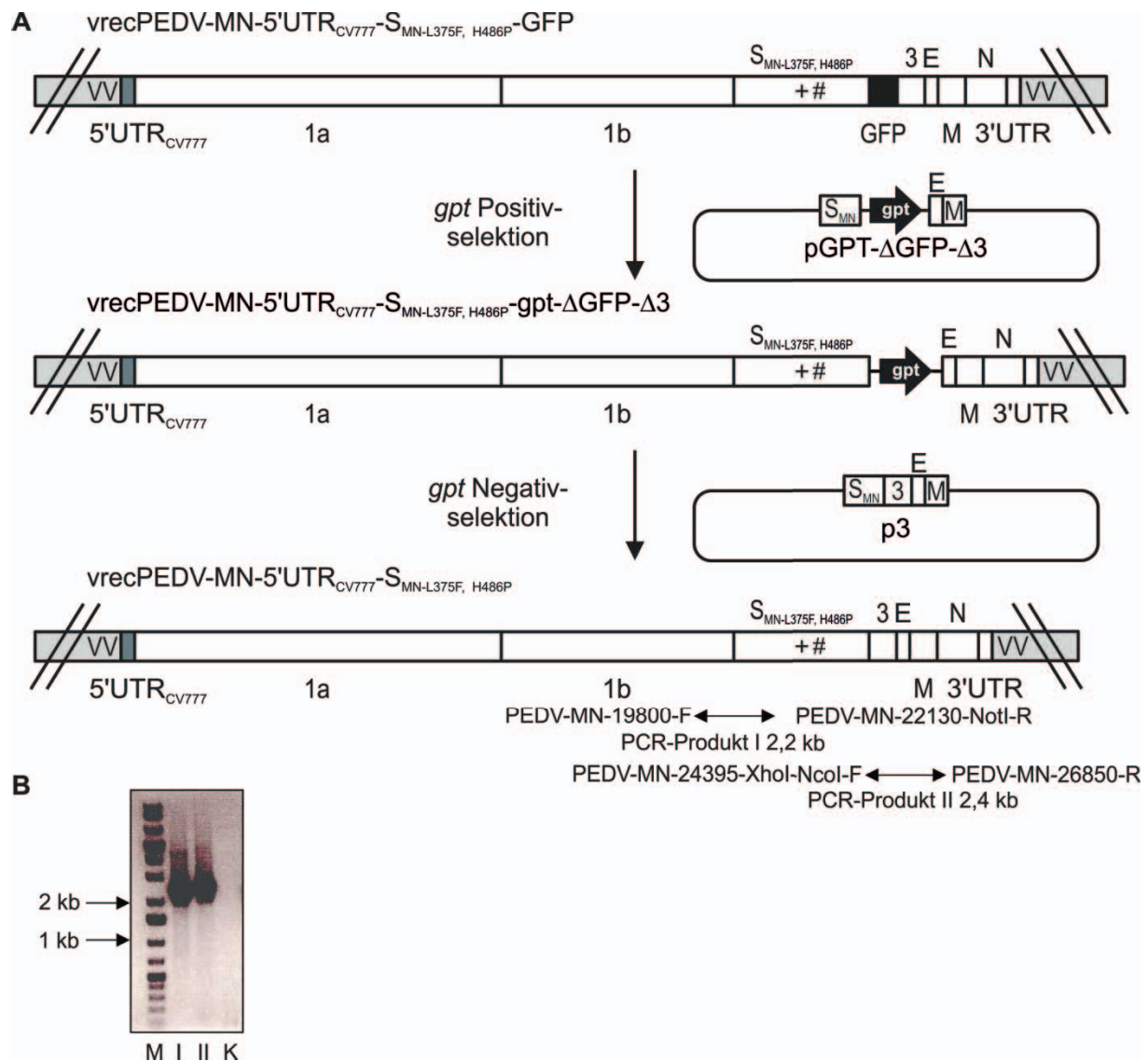
Für den Einsatz in *In-vivo*-Experimenten wurde das GFP-Reportergen aus den verwendeten recPEDVs entfernt. Dazu wurden drei recPEDVs für Tierexperimente generiert: (1) recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> beinhaltet S<sub>MN</sub> mit den beiden, für die Herstellung rekombinanter PEDVs erforderlichen, Mutationen L375F und H486P sowie einen intakten ORF3 (Abb. 35A) (3.7.1), (2) recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> enthält neben einem intakten Gen 3 das S-Gen des Stammes CV777 (Abb. 35B) (3.7.2) und (3) recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>, welches neben S<sub>MN</sub> mit den Modifikationen L375F und H486P eine dem zellkulturadaptierten Virus CV777 entstammende Deletion von 49 Nukleotiden in ORF3 beinhaltet (Abb. 35C) (3.7.3).



**Abb. 35: RecPEDVs für *In-vivo*-Experimente.** (A) Schematische Darstellung der Genomorganisation von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>. ORFs von PEDV MN sind weiß, solche von PEDV CV777 grau und GFP schwarz abgebildet. Ein Pluszeichen bzw. eine Raute zeigen die Modifikationen L375F und H486P an. Die entsprechenden Regionen sind auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (grau hinterlegt) vergrößert abgebildet. (B) Das Genom von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> ist schematisch abgebildet. (C) Darstellung des Genomaufbaus von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>, der Bereich in dem 49 Nukleotide deletiert wurden ist vergrößert abgebildet. Positionsangaben beziehen sich auf die PEDV-MN-Datenbanksequenz.

### 3.7.1 Generierung von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>

Zur Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> wurden im ersten Schritt das GFP-Gen sowie Gen 3 durch das *gpt*-Gen ersetzt. Dies geschah durch homologe Rekombination von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP mit pGPT-ΔGFP-Δ3 und anschließender Positivselektion zur Generierung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-gpt-ΔGFP-Δ3. Durch darauffolgende Transfektion mit p3 entstand nach einer Negativselektion vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (Abb. 36).



**Abb. 36: Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>.** (A) Durch homologe Rekombination wurden das GFP-Gen sowie ORF3 in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-GFP durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt. Im nächsten Schritt wurde dieses durch ein intaktes Gen 3 substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Im S-Gen sind die für den *Rescue* erforderlichen Mutationen L375F und H486P durch ein Pluszeichen bzw. eine Raute markiert. Die Primer zur Kontrolle der Negativselektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Die PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

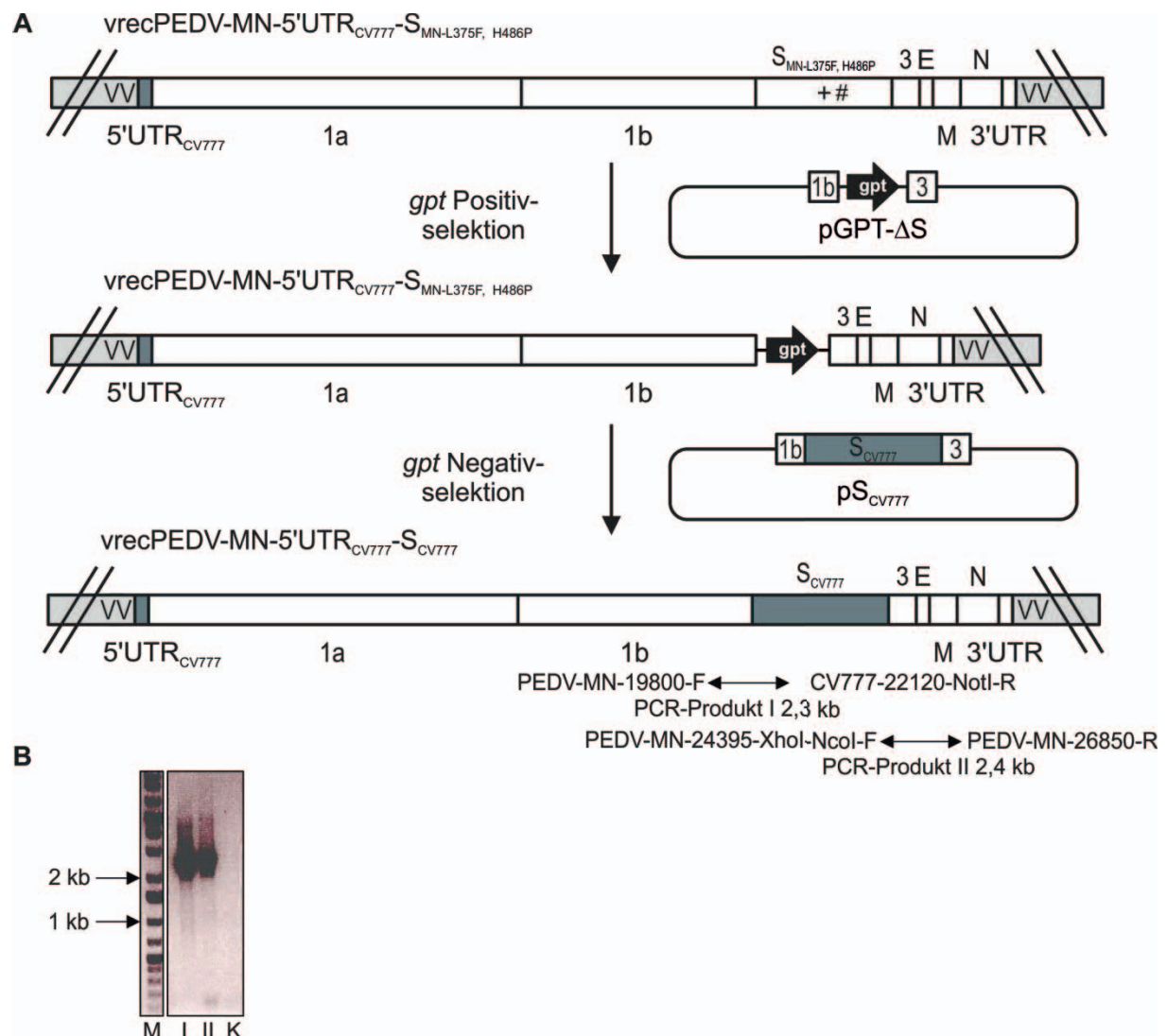
Dieses wurde daraufhin einer Plaquereinigung unterzogen und nach Vollständigkeitskontrolle für die Infektion von BHK-21-Zellen verwendet. Die aus diesen präparierte DNA wurde mit *NotI*-Enzym verdaut, *in-vitro*-transkribiert und die resultierende recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen elektroporiert. Der Elektroporationsüberstand wurde nach 48 Stunden geerntet und die Identität des Virus sowie die Vollständigkeit von



ORF3 durch Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigt. Die so charakterisierten Viren wurden für die Infektion neugeborener Ferkel eingesetzt.

### 3.7.2 Herstellung von $\text{vrecPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}$

Um ein rekombinantes PEDV mit S-Gen des Stammes CV777 in Abwesenheit des GFP-Reportergens zu generieren, wurden CV-1-Zellen mit dem oben beschriebenen Virus  $\text{vrecPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{MN-L375F, H486P}}$  (3.7.1) infiziert und daraufhin mit  $\text{pGPT-}\Delta\text{S}$  transfiziert. Das nach Positivselektion resultierende Virus wurde zur homologen Rekombination mit  $\text{pS}_{\text{CV777}}$  eingesetzt. Dadurch entstand  $\text{vrecPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}$  (Abb. 37A), welches in der anschließenden Negativselektion isoliert, plaquegereinigt und überprüft wurde (Abb. 37A und B).



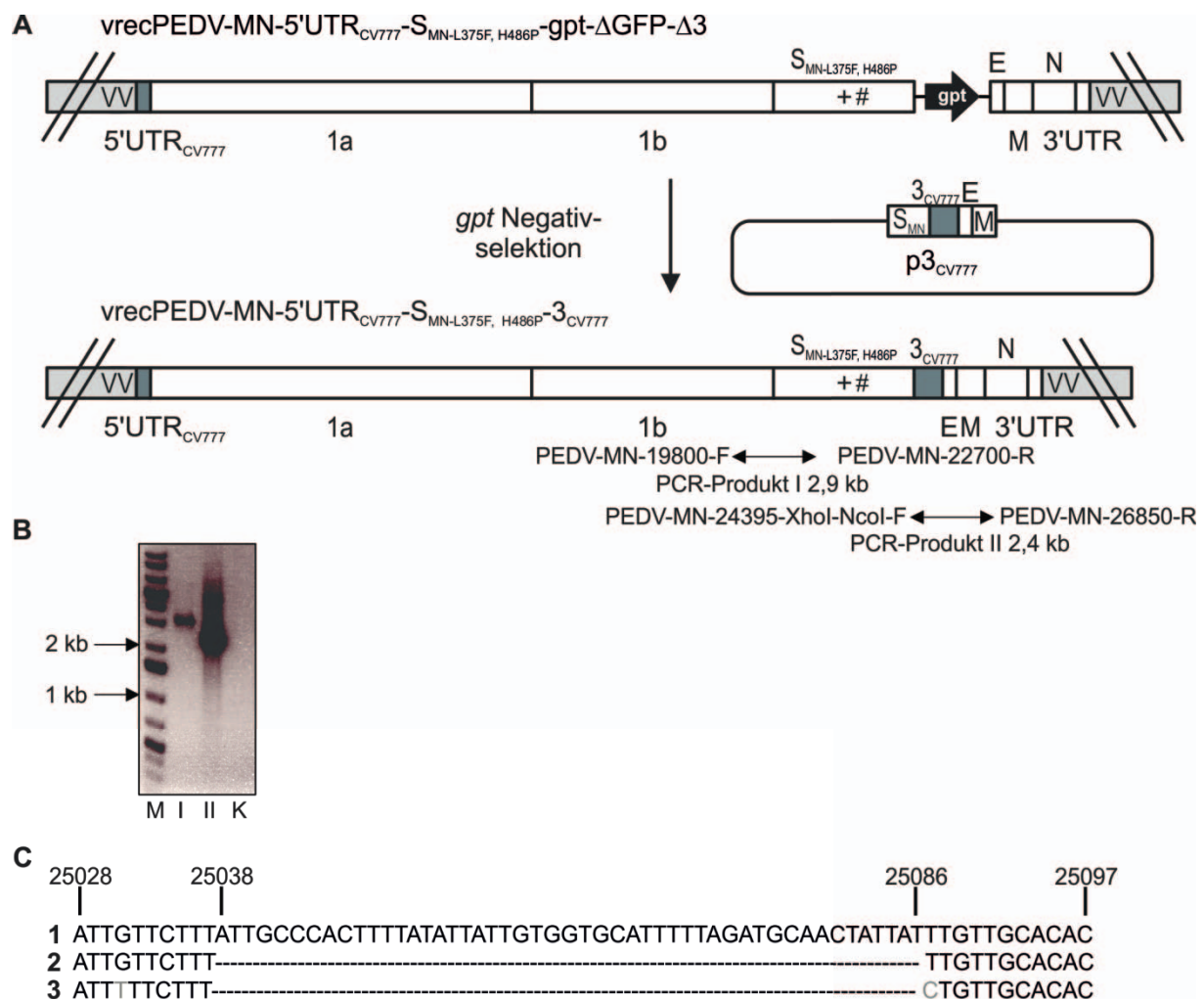
**Abb. 37: Generierung von  $\text{vrecPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{CV777}}$ .** (A) In einer Positivselektion wurde das S-Gen in  $\text{vrecPEDV-MN-5'UTR}_{\text{CV777}}\text{-S}_{\text{MN-L375F, H486P}}$  durch das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) ersetzt. Durch homologe Rekombination wurde dieses anschließend durch  $\text{S}_{\text{CV777}}$  substituiert. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Im S-Gen sind die für den

*Rescue* erforderlichen Mutationen L375F und H486P durch ein Pluszeichen bzw. eine Raute markiert. Pfeile kennzeichnen die Primer zur Kontrolle der Negativselektion. (B) Die PCR-Produkte I und II wurden im 1,5%igen Agarosegel dokumentiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus).

Auf die DNA-Herstellung im präparativen Maßstab folgten ein *NotI*-Restriktionsverdau, *In-vitro*-Transkription, sowie Elektroporation von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>-RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen. Der Zellkulturüberstand wurde nach Titration und Überprüfung der Virusidentität als Inokulat im Tierversuch verwendet.

### 3.7.3 Herstellung eines recPEDV mit einer Deletion in ORF3 zur Untersuchung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV

Vielfach konnte im Rahmen der Zellkulturadaptation von PEDVs eine Deletion in ORF3 beobachtet werden, welche in der Bildung eines trunkierten Genproduktes resultiert (Park, S. J. et al. 2008). Insbesondere in Asien ist der Einsatz solcher *in-vitro*-adaptierten Viren als Lebendvakzine weit verbreitet, da diese nach Immunisierung kaum Symptome verursachen (Kweon et al. 1999, Song, D. S. et al. 2007). Um die Rolle von ORF3 in der Pathogenese der PED zu untersuchen, wurden im Folgenden 49 Nukleotide in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-L375F, H486P deletiert und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> entstand (Abb. 38). Dazu wurde, basierend auf einem Sequenzvergleich von Gen 3<sub>MN</sub> mit Gen 3<sub>CV777</sub>, Plasmid p3<sub>CV777</sub> konstruiert. Dieses beinhaltet, neben den für die homologe Rekombination notwendigen Genombereichen, das Gen 3<sub>MN</sub> mit Deletion der Nukleotide 25038-25086 (Abb. 38C). Nach Infektion von CV-1-Zellen mit vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-gpt-ΔGFP-Δ3 wurden diese mit p3<sub>CV777</sub> transfiziert und vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> durch Negativselektion hergestellt (Abb. 38A und B). Auf eine Plaquereinigung mit Vollständigkeitskontrolle der PEDV-cDNA folgte die DNA-Herstellung im präparativen Maßstab mit anschließendem *NotI*-Verdau und *In-vitro*-Transkription. Der nach Elektroporation von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>-RNA in BHK-PEDV<sub>MN</sub>-N-Zellen geerntete Zellkulturüberstand diente nach Verifizierung der eingefügten Mutation und Titration als Inokulum für neugeborene Ferkel.



**Abb. 38: Herstellung von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>.** (A) Zur Herstellung von vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> wurde das *gpt*-Gen (schwarzer Pfeil) in vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-gpt-ΔGFP-Δ3 durch Gen 3 mit Deletion der Nukleotide 25038-25086 (3<sub>CV777</sub>) ersetzt. PEDV-MN-cDNA ist weiß, PEDV-CV777-cDNA grau, Vacciniavirusgenom hellgrau und das GFP-Gen schwarz dargestellt. Die für den Rescue erforderlichen Mutationen im S-Gen sind durch ein Pluszeichen (L375F) bzw. eine Raute (H486P) markiert. Pfeile kennzeichnen die Primer zur Kontrolle der Negativselektion. (B) Die zugehörigen PCR-Produkte wurden im 1,5%igen Agarosegel analysiert (M: DNA-Größenmarker; I: PCR-Produkt I; II: PCR-Produkt II; K: Kontrolle auf Ausgangs-Vacciniavirus). (C) Sequenzvergleich der Nukleotide 25028-25097 in ORF3 von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (1), recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> (2) und CV777 (3). Die Deletion der Nukleotide 25038-25086 in (2) und (3) ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Von der MN-Sequenz abweichende Nukleotide sind grau dargestellt.

### 3.8 Infektion von Ferkeln mit recPEDVs

#### 3.8.1 Untersuchung des Einflusses des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV *in vivo*

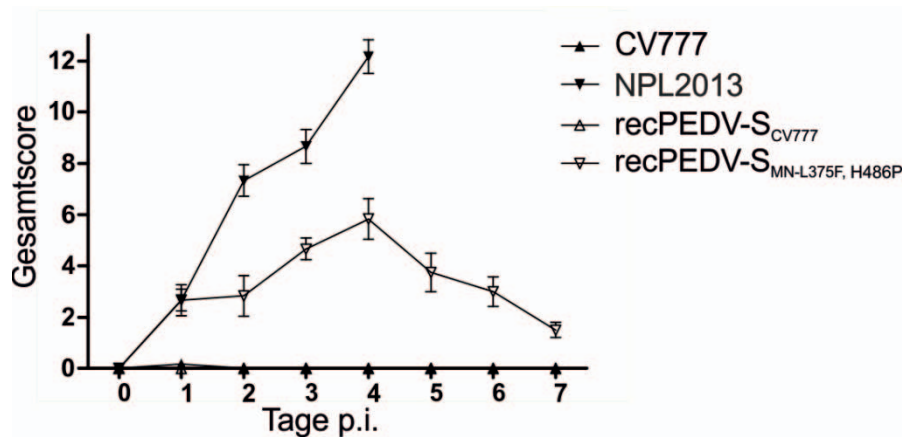
Neben der Bedeutung des coronaviralen S-Proteins für Rezeptorbindung und Zellfusion wird diesem ebenfalls eine Auswirkung auf die Virulenz unterschiedlicher Isolate zugeschrieben. Dies kann am Beispiel von TGEV, aus welchem durch Deletion von 621-681 Nukleotiden in



der S1-Domäne das nur geringgradig virulente PRCV entsteht, verdeutlicht werden (Saif & Wesley 1999). Auch bei PEDV wird das S-Gen als Virulenzfaktor diskutiert (Chen, Q. et al. 2016, Hou et al. 2017, Vlasova et al. 2014, Wang, D. et al. 2018, Wang, L. et al. 2016) (1.2.3.1). Um zu untersuchen, ob der im Rahmen dieser Arbeit generierte recPEDV-MN-Klon in der Lage war, PED auszulösen und ob ein Austausch des S-Proteins einen Einfluss auf die Virulenz hat, wurden je 6 SPF Ferkel pro Virus mit Elektroporationsüberstand von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (3.7.1) und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> (3.7.2) infiziert. Darüber hinaus wurden ebenfalls je 6 Ferkel mit der 11. Zellkulturpassage des hochvirulenten Feldstammes NPL2013 sowie dem zellkulturadaptierten Stamm CV777 inokuliert. 48 Stunden nach der Infektion wurden jeder der streng getrennt gehaltenen Gruppen 2 weitere Ferkel zugeführt, um die Übertragung der PEDVs durch direkten Kontakt zu untersuchen.

#### **3.8.1.1 Klinische Beurteilung nach Infektion von Ferkeln mit recPEDVs mit unterschiedlichen S-Genen**

Ferkel, die mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> und NPL2013 infiziert wurden, zeigten bereits 12 Stunden p.i. schwere, für PED typische klinische Symptome wie Diarrhö, Vomitus und Exsikkose. Dies galt ebenfalls für die Kontakttiere. Die Ferkel wurden durch Tierärzte nach einem bestimmten Schema („*Clinical score*“) bezüglich ihres Appetits, des Allgemeinbefindens, der Atmung, ihres Ganges, des Grades der Diarrhö sowie der Dehydratation, der inneren Körpertemperatur und ihres Gewichtes beurteilt (Abb. 39). Nach dieser Bewertung erreichten alle Tiere in der mit NPL2013 infizierten Gruppe bereits am 4. Tag p.i. die Abbruchkriterien und mussten euthanasiert werden. In der mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> infizierten Gruppe wurde ebenfalls am 4. Tag p.i. die schwerste Ausprägung der Symptome beobachtet, es wurde jedoch nur die Hälfte der Tiere euthanasiert da hier die Abbruchkriterien noch nicht komplett erreicht wurden. Die restlichen 3 Ferkel verblieben bis Tag 7 in der Stallung. Ferkel, die das rekombinante Virus basierend auf der MN-Sequenz mit S<sub>CV777</sub> (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>) oder CV777 als Inokulat erhalten hatten, zeigten keine klinischen Symptome. Auch hier wurde die Hälfte der Gruppe an Tag 4, der Rest an Tag 7 p.i. euthanasiert. Für die Kontakttiere wurde der Endzeitpunkt 48 Stunden nach Gruppenzuführung gewählt.



**Abb. 39: Klinischer Score nach Infektion mit recPEDVs.** Die infizierten Ferkel wurden täglich in den Kategorien Lebhaftigkeit (1), Körperform (2), Gang (3), Atmung (4), Augen (5), Appetit (6) und Kotabsatz (7) mit 0-3 Punkten bewertet, wobei 0 der physiologischen Ausprägung entsprach und 3 hochgradig pathologisch war. Durch Addition aller Punkte ergab sich der Gesamtscore. Wurde ein Gesamtscore von 14 oder höher erreicht, wurde der Versuch für das jeweilige Tier abgebrochen. Das gleiche galt wenn in einer der Kategorien 1 oder 3-6 ein Wert von 3 erreicht wurde (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

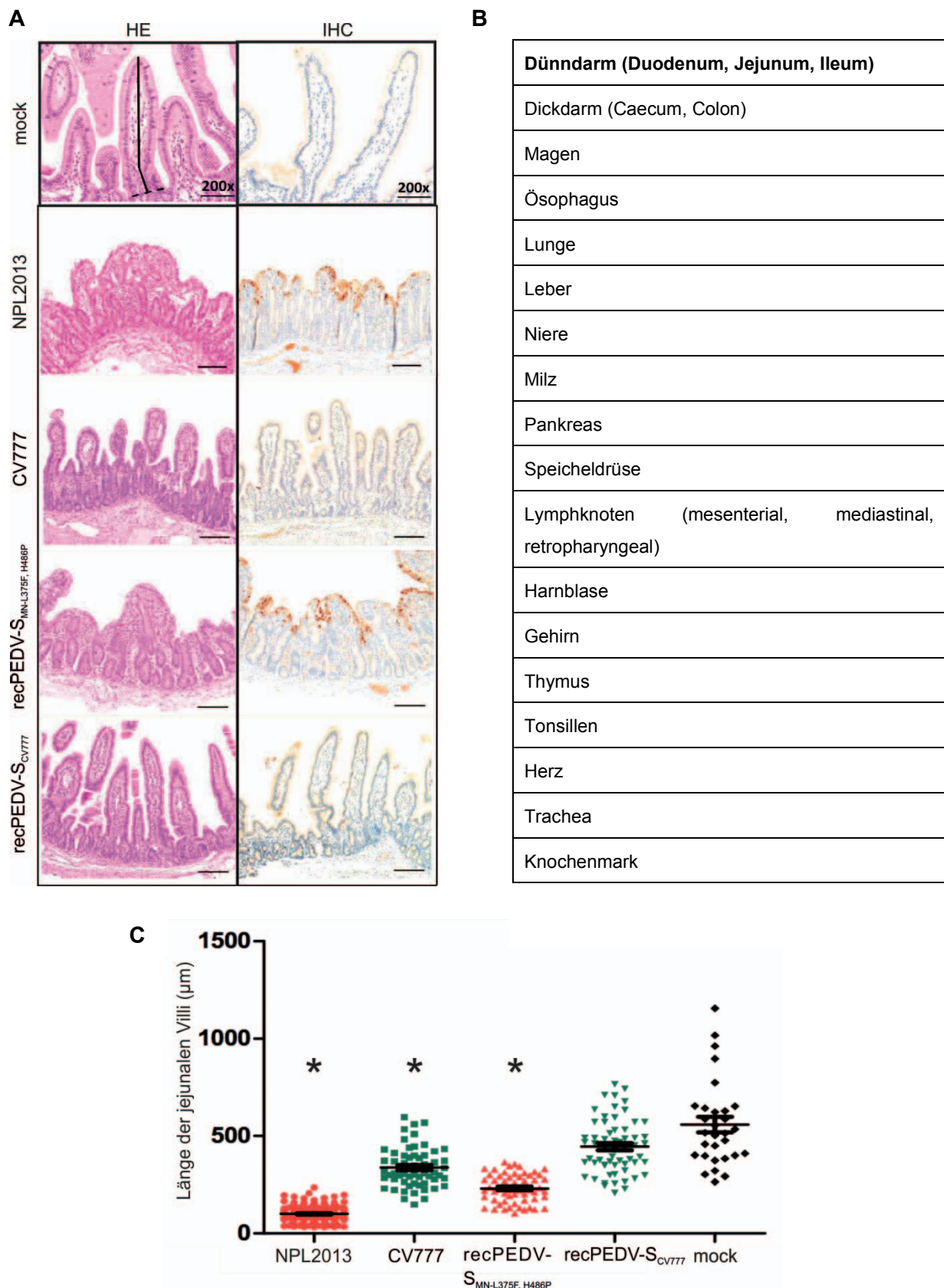
Den klinischen Symptomen zu Folge war der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene cDNA-Klon von PEDV MN in der Lage, ebenso wie der Feldstamm NPL2013, hochgradige PED auszulösen und bietet damit eine wertvolle Plattform für die Erforschung der molekularen Pathogenese der PED. Der zellkulturadaptierte Stamm CV777 hingegen war nicht in der Lage, einen PED-Ausbruch zu verursachen. Ebenso verhielt es sich mit dem recPEDV, welches das S-Gen des Stammes CV777 beinhaltet. Da die mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> infizierten Ferkel über den gesamten Verlauf der Studie keine klinischen Symptome zeigten, resultierte der alleinige Austausch des S-Gens durch das eines zellkulturadaptierten Stammes in einer Attenuierung, was für einen direkten Einfluss des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV spricht. Weitere Analysen der entnommenen Proben unterstützen die klinischen Beobachtungen (3.8.1.2-3.8.1.4).

### 3.8.1.2 Pathologische und histopathologische Untersuchung infizierter Ferkel

Die pathologische Untersuchung der mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> und NPL2013 infizierten Tiere sowie der Kontakttiere zeigte eine drastische Auszehrung und Dehydratation der Ferkel an Tag 4 p.i bzw. 2 post contact (p.c). Der dilatierte Magen enthielt unverdaute Milch in großer Menge und zeigte fokale Schleimhautblutungen. Dünn- und Dickdarm waren hochgradig mit Gas und grün-gelblichem wässrigen Inhalt gefüllt. Bei den an Tag 7 euthanasierten Ferkeln war der Grad der Auszehrung geringer, außerdem wurde eine pastöse Konsistenz des Darminhalts beobachtet. Mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>

und CV777 infizierte Tiere zeigten weder an Tag 4 noch an Tag 7 p.i. pathologische Abweichungen von nicht infizierten Kontrolltieren.

Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung von Organproben wurden pathologische Abweichungen von der Norm nur im Intestinaltrakt und hier nur nach Infektion mit NPL2013 und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F, H486P</sub></sub> festgestellt (Abb. 40). Dabei war vor allem das Dünndarmepithel betroffen. Dieses zeigte nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eine schwere Atrophie der Darmzotten mit multifokaler Nekrose der Zottenspitzen (Abb. 40A). Außerdem war eine Abnahme der Anzahl der Becherzellen im Epithel festzustellen, ebenso wie Infiltrate von neutrophilen Granulozyten in der Lamina propria. Die Analyse der Längenmessung der intestinalen Villi zeigte eine hochgradige Zottenverkürzung bei mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F, H486P</sub></sub> und NPL2013 infizierten Gruppen (Abb. 40C). Diese stellte sich jedoch bei den mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F, H486P</sub></sub> infizierten und am 7. Tag p.i. euthanasierten Tieren weniger dramatisch dar, was auf eine Reorganisation des intestinalen Epithels hinweist. Außer einer statistisch signifikanten Reduktion der Villuslänge ab dem 4. Tag p.i. nach Infektion mit CV777 waren in den mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> und CV777 infizierten Gruppen keine histopathologischen Abweichungen festzustellen. Ein immunhistochemischer Nachweis von PEDV-Antigen (2.2.8.2) gelang ebenfalls nur in Dünndarmproben von Ferkeln, die mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F, H486P</sub></sub> oder NPL2013 infiziert wurden (Abb. 40A und B).

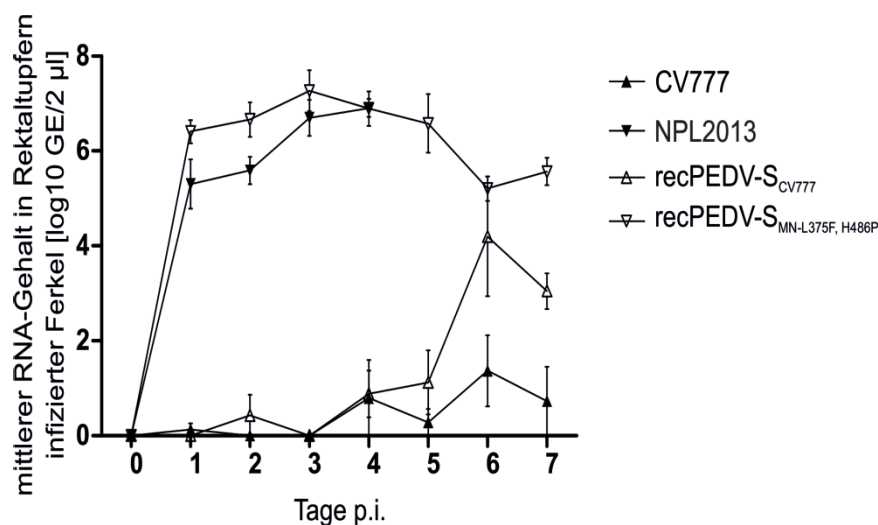


**Abb. 40: Histopathologische Untersuchungen.** (A) Die linke Spalte zeigt von oben nach unten HE-gefärbte Dünndarmschnitte (Inês Veiga, Bern) von nicht (mock) infizierten Ferkeln sowie mit PEDV NPL2013, CV777 und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F, H486P</sub></sub> sowie recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> infizierten Tieren 4 Tage p.i. in 200facher Vergrößerung. Ein schwarzer Strich in der oberen linken Abbildung zeigt die zur Längenmessung der

Villi verwendete Strecke. In der rechten Spalte ist der immunhistochemische Nachweis von PEDV-Antigen mit einem anti-PEDV-M-Antikörper dargestellt. (B) Eine Tabelle dokumentiert die einer histopathologischen Untersuchung unterzogenen Organe, Bereiche in denen Veränderungen zu finden waren sind fett dargestellt. (C) Die modifizierte Abbildung nach Inês Veiga, Bern, zeigt die Längenmessung ( $\mu\text{m}$ ) der jejunalen Darmzotten von mit PEDV NPL2013, CV777, recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F</sub>, H486P</sub> sowie recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> infizierten Tieren mit der CellSens® software, OLYMPUS. Es wurden jeweils 30 Villi pro Tier gemessen. Ein Stern markiert signifikante Abweichungen nach dem *multilevel linear regression model* ( $p < 0,005$  nach Vergleich mit mock-infizierten Tieren) (Abb. modifiziert nach Inês Veiga, Bern).

### 3.8.1.3 Untersuchung des Virusgehaltes in Tupfer- und Blutproben

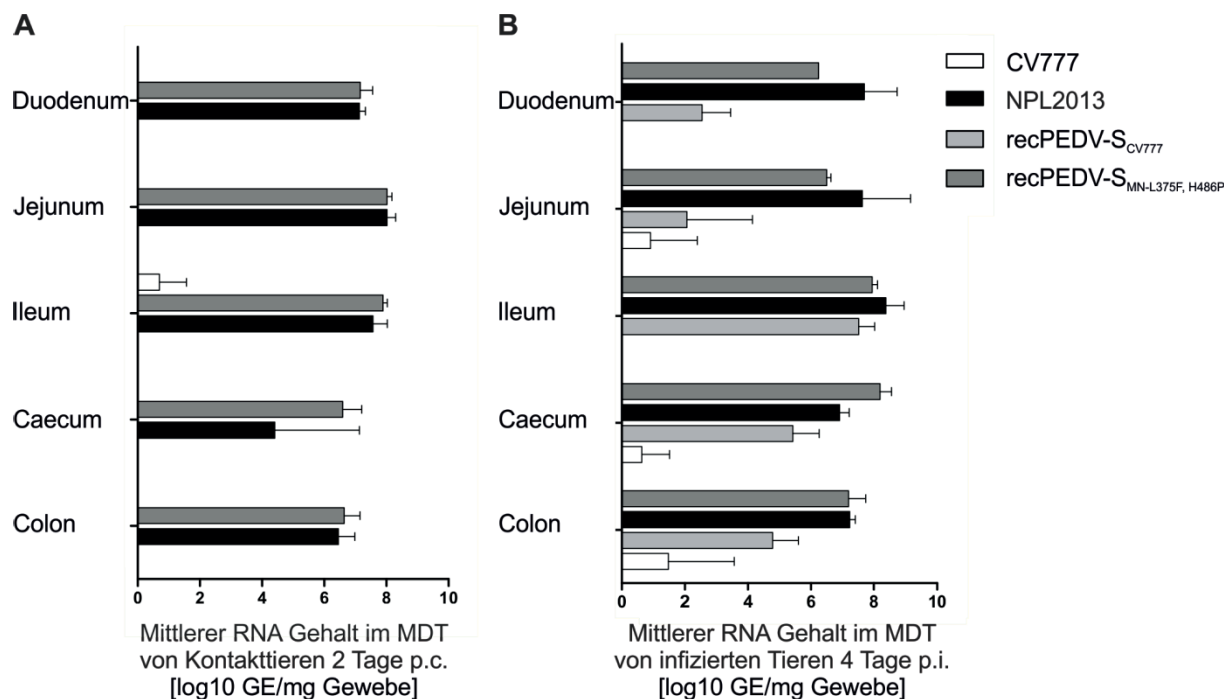
Zum Nachweis der Virusausscheidung wurde aus den täglich entnommenen Oronasal- und Rektaltupferproben sowie aus Serumproben RNA isoliert. Diese wurde daraufhin in einer quantitativen RT-PCR (TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix, Applied Biosystems™) mit PEDV-spezifischen Primern und Sonde analysiert. Die Berechnung der Genomäquivalente (GE) erfolgte anhand einer von PEDV-RNA erstellten Standardkurve, die in jeden PCR-Lauf einbezogen wurde. Die Auswertung zeigte eine konstante, hohe Virusausscheidung in Tupferproben nach Infektion mit NPL2013 und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F</sub>, H486P</sub> ab 24 Stunden p.i. mit einem Maximum nach 4 bzw. 3 Tagen (Abb. 41). Die beiden anderen Versuchsgruppen (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> und CV777) zeigten eine signifikant niedrigere rektale sowie oronasale Virausscheidung, welche interessanterweise erst ab dem 5. Tag p.i. anstieg. Hierbei lagen die Werte für recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> deutlich oberhalb der Ausscheidung des zellkulturadaptierten Stammes. Eine Virämie konnte in allen infizierten Ferkeln nachgewiesen werden, wobei auch hier die RNA-Mengen im Blut in den mit NPL2013 und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F</sub>, H486P</sub> infizierten Gruppen gegenüber den anderen Tieren deutlich erhöht waren.



**Abb. 41: Rektale PEDV Ausscheidung.** Nachweis von PEDV-RNA durch qRT-PCR in Rektaltupfern nach Infektion mit CV777, NPL2013, recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>CV777</sub></sub> (recPEDV-S<sub>CV777</sub>) und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777-S<sub>MN-L375F</sub>, H486P</sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) ab dem Tag der Infektion bis 7 Tage p.i. (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

### 3.8.1.4 Nachweis von PEDV-RNA in Organproben

Um den RNA-Gehalt in Organproben (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Leber, Milz, mesenteriale und mediastinale Lymphknoten, Tonsillen, Lunge, Speicheldrüse, Niere) infizierter Ferkel zu bestimmen, wurden diese ähnlich wie die Tupferproben einer RNA-Präparation mit anschließender qRT-PCR unterzogen (3.8.1.3). Hier konnte RNA von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> und NPL2013 in allen Organen nachgewiesen werden (Abb. 42B). Dies traf ebenfalls für die nach 48 Stunden euthanasierten Kontakttiere zu (Abb. 42A). RNA von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> wurde ebenfalls in allen Organen infizierter Tiere in niedrigerer Menge gefunden. CV777-RNA konnte sporadisch in geringer Menge in allen Organen mit Ausnahme der mediastinalen Lymphknoten sowie der Niere nachgewiesen werden (Abb. 42).



**Abb. 42: Gehalt von PEDV-RNA in Organproben.** (A) Der mittlere RNA-Gehalt in Organen des Magen-Darm-Traktes (MDT) von Kontakttieren 2 Tage nach Einführung (*post contact*, p.c.) in die mit CV777, NPL2013, recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> (recPEDV-S<sub>CV777</sub>) und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) infizierten Gruppen in log10 GE/mg Gewebe (GE = Genomäquivalente) ist dargestellt. (B) Darstellung des RNA-Gehalts in Darmabschnitten von infizierten Ferkeln 4 Tage p.i. (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

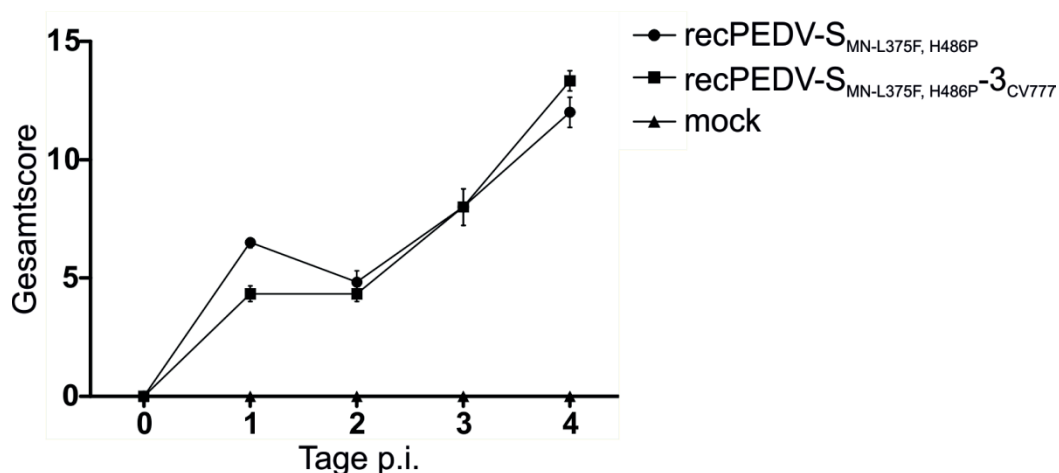
### 3.8.2 Untersuchung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV *in vivo*

Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, ließ das Auftreten einer Deletion in ORF3, welche in einem trunkierten Genprodukt resultiert, in durch Zellkulturadaptation attenuierten PEDV-Impfstämmen einen Zusammenhang zwischen dem verkürzten Gen 3 und der Attenuierung *in vivo* vermuten. Diese Hypothese sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Dazu wurden in einem zweiten Tierexperiment 6 SPF Ferkel mit je  $10^4$  PFU eines recPEDV, welches einen trunkierten ORF3 besitzt (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>) (3.7.3) infiziert. Nach 48 Stunden wurden 2 weitere Ferkel eingestallt, um die Virusübertragbarkeit zu evaluieren. Eine andere Gruppe erhielt erneut das entsprechende recPEDV mit intaktem ORF3 (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) als Inokulum, dessen Virulenz bereits im vorherigen Tierversuch (3.8.1) bestätigt worden war und welches daher als Kontrollvirus diente.

### 3.8.2.1 Klinische Beurteilung des Einflusses von Gen 3 auf die Pathogenese der PED

Die klinische Beurteilung der Ferkel erfolgte wie in Kapitel 3.8.2.1 beschrieben. Wie bereits im vorherigen Versuch stellte sich das Kontrollvirus recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> mit intaktem ORF3 hochvirulent dar. Die Tiere zeigten bereits 12 Stunden p.i. heftige Symptome in Form von Vomitus und Diarrhö. Aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der Ferkel wurden am 4. Tag p.i. die Abbruchkriterien erreicht und der Versuch terminiert (Abb. 43). In der mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>, welches ein trunkiertes Gen 3 kodiert, infizierten Gruppe traten erste Symptome leicht verzögert auf, diese waren jedoch bereits 48 Stunden p.i. ebenso deutlich ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe (Abb. 43). Die nach 2 Tagen zugeführten Kontakttiere zeigten 12 Stunden nach Einstellung eine vergleichbare Klinik. Da die Abbruchkriterien erreicht wurden, wurde der Versuch in der mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> infizierten Gruppe ebenfalls nach 4 Tagen abgebrochen und alle Tiere euthanasiert.



**Abb. 43: Klinischer Score nach Infektion mit recPEDVs mit intaktem (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) und trunkierten ORF3 (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>).** Die tägliche Bewertung der infizierten Ferkel in den Kategorien Lebhaftigkeit (1), Körperform (2), Gang (3), Atmung (4), Augen (5), Appetit (6) und Kotabsatz (7) mit 0 (physiologisch) bis 3 (hochgradig pathologisch) Punkten und Summierung aller Punkte ergab den Gesamtscore. Betrug dieser 14 oder höher, wurde der Versuch für das jeweilige Tier abgebrochen. Das gleiche galt wenn in

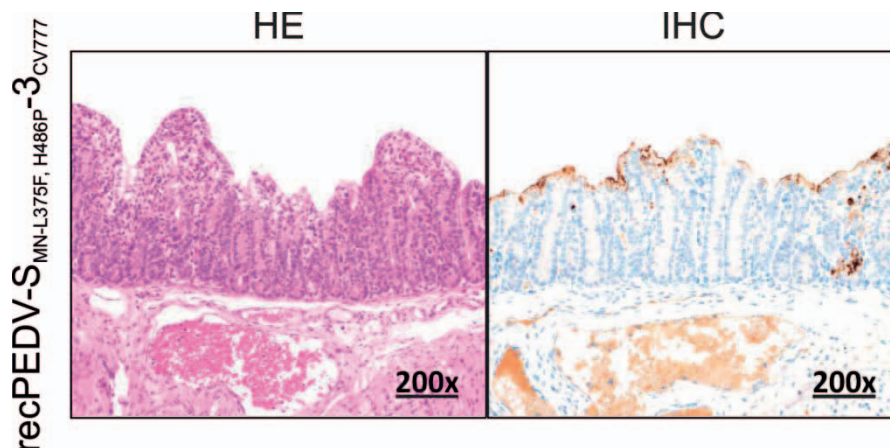


einer der Kategorien 1 oder 3-6 ein Wert von 3 erreicht wurde (mock: nicht infizierte Kontrollgruppe) (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

### 3.8.2.2 Pathologische und histopathologische Untersuchung infizierter Ferkel zur Untersuchung von Gen 3

Die pathologische Untersuchung der mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> infizierten Kontrolltiere zeigte ähnliche makroskopische Veränderungen wie in Kapitel 3.8.1.2 beschrieben. Auch nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> waren die Ferkel deutlich dehydriert und ausgezehrt, der Darm war dilatiert und enthielt große Mengen flüssigen, gelb-grünlichen Darminhalts.

Die histopathologische Untersuchung, welche analog zu Kapitel 3.8.1.2 durchgeführt wurde, korrelierte mit dem klinischen Bild nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>. Die HE-Färbung zeigte eine deutliche Atrophie der Dünndarmzotten (Abb. 44). Diese wurde durch die, mittels Längenmessung der intestinalen Villi festgestellte, Reduktion der Zottenlänge bestätigt. Immunhistochemisch war PEDV-Antigen in Dünndarmabschnitten nachweisbar.



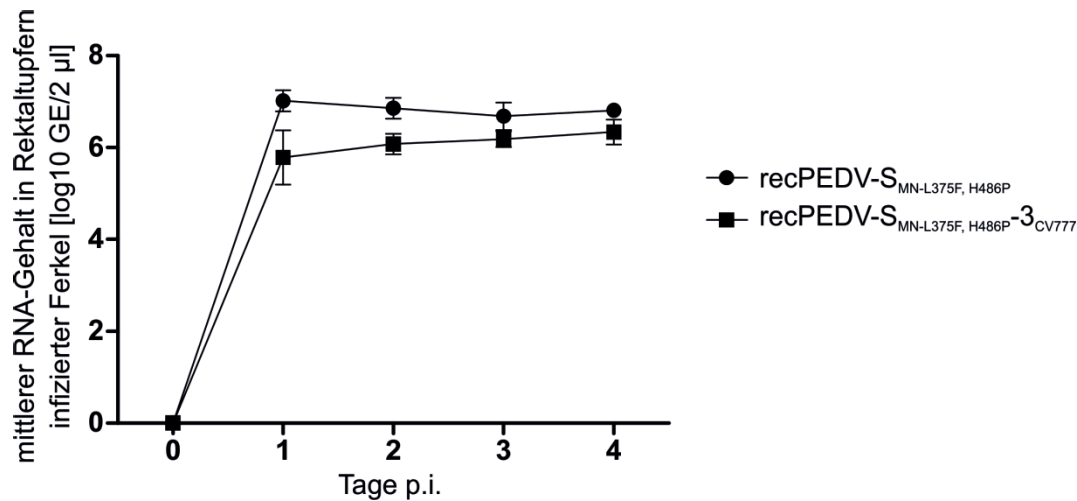
**Abb. 44: Histopathologische Untersuchung zur Evaluierung des Einflusses von Gen 3 auf die Virulenz von PEDV.** Auf der linken Seite ist ein HE-gefärbter Dünndarmschnitt (Inês Veiga, Bern) von mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>) infizierten Ferkeln 4 Tage p.i. in 200facher Vergrößerung dargestellt. Die rechte Seite zeigt den immunhistochemischen Nachweis von PEDV-Antigen mit einem anti-PEDV-M-Antikörper (Abb. modifiziert nach Inês Veiga, Bern).

### 3.8.2.3 Untersuchung des Virusgehaltes in Tupfer- und Blutproben

Zur Beurteilung der Virusausscheidung wurden wie in Kapitel 3.8.1.3 beschrieben Rektal- und Oronasaltupfer sowie Serumproben untersucht. Die Virusausscheidung in Proben von mit dem Kontrollvirus infizierten Tieren war dabei vergleichbar hoch wie im vorherigen Versuch. Der Virusgehalt in Tupfern nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F,</sub>



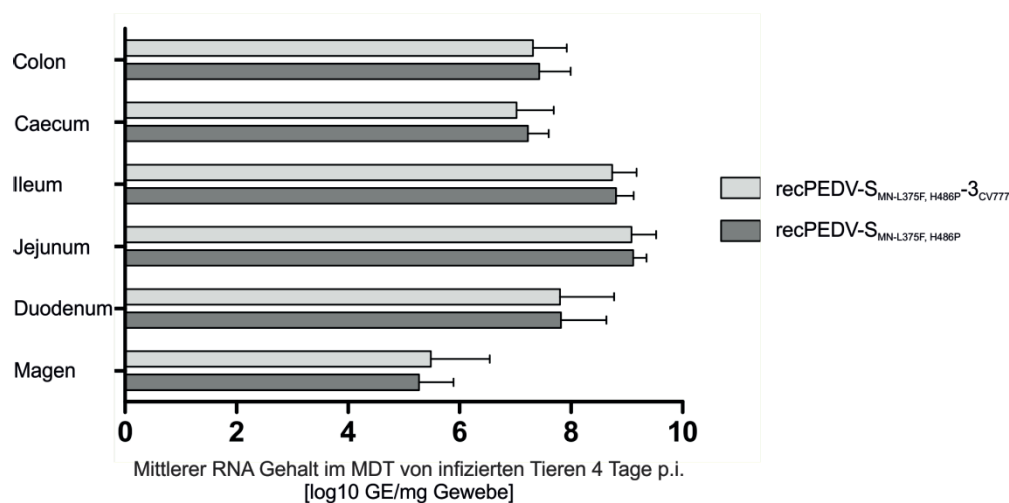
H486P-3<sub>CV777</sub> unterschied sich nur minimal vom Kontrollvirus (Abb. 45), auch eine vergleichbare Virämie wurde detektiert.



**Abb. 45: PEDV Ausscheidung in den Fäzes.** Durch qRT-PCR wurde der mittlere RNA-Gehalt in Rektaltupfern nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P-3<sub>CV777</sub></sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P-3<sub>CV777</sub></sub>) ab dem Tag der Infektion bis zum 4. Tag p.i. ermittelt (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

### 3.8.2.4 Nachweis von PEDV-RNA in Organproben

Zur Beurteilung der Organverteilung von recPEDVs wurden ebenso wie in Kapitel 3.8.1.4 Organproben mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei konnte RNA von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P-3<sub>CV777</sub></sub> in allen untersuchten Organen in mit dem Kontrollvirus recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> vergleichbarer Menge nachgewiesen werden (Abb. 46).



**Abb. 46: PEDV-RNA-Gehalt in Organproben.** Der mittlere RNA-Gehalt in Organen des Magen-Darm-Traktes (MDT) von mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>) und recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P-3<sub>CV777</sub></sub> (recPEDV-S<sub>MN-L375F, H486P-3<sub>CV777</sub></sub>) infizierten Ferkeln 4 Tage p.i. ist in log10 GE/mg Gewebe

(GE = Genomäquivalente) dargestellt (Abb. modifiziert nach Kristen-Burmann & Rogger et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die Auswertung der Tupfer- und Organproben korreliert mit dem klinischen Verlauf nach Infektion mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Deletion von Gen 3 nicht zu einer Attenuierung des Virus *in vivo* führt und Gen 3 dementsprechend nicht als Virulenzfaktor fungiert.

## 4 Diskussion

Das Virus der porcinen epidemischen Diarrhö (PEDV) ist ein weltweit vorkommender, wichtiger Krankheitserreger bei Schweinen. Das Krankheitsbild der porcinen epidemischen Diarrhö (PED) ist durch Vomitus und Diarrhö mit nachfolgender Dehydratation geprägt und betrifft meist Saugferkel, die in hohen Prozentzahlen erkranken. Das Auftreten hochvirulenter Varianten in Asien und den USA in den letzten Jahren hat weltweit zu großer Besorgnis bei Schweinehaltern und Tierärzten geführt (Huang et al. 2013, Stevenson et al. 2013). Anders als bei den in den 1980er und 1990er Jahren in Europa und Asien zirkulierenden klassischen Stämmen betrug die Mortalität bei neugeborenen Ferkeln fast immer annähernd 100 %, woraus hohe wirtschaftliche Einbußen resultierten (Lin et al. 2016). Abgesehen von diesen hochvirulenten Isolaten wurden in den letzten Jahren auch in Europa, den USA und Asien Viren mit Insertionen und Deletionen im S-Gen (S-INDEL) nachgewiesen, die meist einen milden Krankheitsverlauf verursachten (Lin et al. 2016, Vlasova et al. 2014, Wang, L. et al. 2014). Um eine schnelle Differenzierung der hochvirulenten von klassischen oder schwachvirulenten Viren zu ermöglichen, ist es nötig, biologische Marker der unterschiedlichen Varianten zu identifizieren. Diese sollten anschließend bei der Etablierung neuer diagnostischer Verfahren berücksichtigt werden. Revers-genetische Systeme sind wertvolle Instrumente im Hinblick auf die Identifizierung solcher Marker und zur Entwicklung neuer Vakzinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein revers-genetisches System für einen US-Feldstamm von PEDV etabliert und das rekombinante Virus daraufhin im Tierversuch charakterisiert. Anschließend wurden rekombinante Viren mit Modifikationen in S-Gen und Gen 3 hergestellt und der Einfluss dieser Gene auf die Virulenz *in vivo* evaluiert.

### 4.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für einen nordamerikanischen PEDV-Feldstamm

Da zu Beginn dieser Arbeit kein hochvirulentes PEDV-Feldisolat im institutseigenen Labor vorhanden war, wurde das im Rahmen dieser Arbeit etablierte revers-genetische System basierend auf der Genbank-Datenbanksequenz des Feldstammes Minnesota (MN) aufgebaut. Dieser wurde als einer der ersten US-amerikanischen Stämme aus Tieren mit schwerer klinischer PED isoliert und sequenziert (Huang et al. 2013). Basierend auf der Datenbanksequenz wurden überlappende cDNA-Fragmente synthetisiert (Genscript), subkloniert und mittels homologer Rekombination in ein Vacciniavirus als Vektor eingeführt (vrecPEDV-MN). Jedoch konnte ausgehend von diesem cDNA-Klon kein recPEDV-MN hergestellt werden.

Da die Zellkulturpropagation von PEDV-Feldstämmen nicht immer erfolgreich ist (Chen, Q. et al. 2014, Hofmann, M. & Wyler 1988, Oka et al. 2014) und wesentlich vom coronaviralen Spike-Protein beeinflusst wird (Li, W. et al. 2016, Li, W. et al. 2015, Millet & Whittaker 2015, Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011), wurde anschließend überprüft, ob das S<sub>MN</sub>-Gen ausschlaggebend für den Misserfolg bei der Herstellung von rec-PEDV-MN war. Zu diesem Zweck wurde das S-Gen in vrecPEDV-MN durch das des zellkulturadaptierten Stammes CV777 ersetzt. Gleichzeitig wurde Gen 3 durch ein GFP-Reporter-gen (vrecPEDV-MN-S<sub>CV777</sub>-Δ3-GFP) ersetzt, um den Nachweis rekombinanter Viren zu erleichtern (Hertzog et al. 2004, Tekes et al. 2008, Thiel et al. 2001) und einen hemmenden Effekt von Gen 3 auf die Replikation von PEDV *in vitro* auszuschließen (Jengarn et al. 2015, Wongthida et al. 2017). Allerdings war auch hier die Herstellung von recPEDV-MN nicht möglich, sodass Fehler in der Datenbanksequenz außerhalb des S-Gens als Ursache für den Misserfolg vermutet wurden.

#### 4.1.1 Einfluss der PEDV-5'UTR-Sequenz auf die Herstellung rekombinanter PEDVs

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der erfolglosen Herstellung von recPEDV-MN und der 5'UTR der Datenbanksequenz bestand. Da konventionelle Sequenzierungsmethoden häufig nur unvollständige Ergebnisse im Bereich der 5'- und 3'-Genomenden liefern, wurde die exakte Sequenz der 5'UTR des zellkulturadaptierten Stammes CV777 mit einer 5'-RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) bestimmt. Die Einführung dieser Sequenz (5'UTR<sub>CV777</sub>) in das rekombinante PEDV-MN mit S<sub>CV777</sub> und Substitution von ORF3 durch GFP ermöglichte die Herstellung und *In-vitro*-Kultivierung rekombinanter Viren. Ein anschließender Vergleich der 5'UTR<sub>MN</sub>- und 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenzen zeigte vier Nukleotidunterschiede.

Bei der 5'UTR handelt es sich um einen nichttranslatierten Bereich von etwa 300 Nukleotiden am 5'-Genomende, der wichtige *cis*-aktive Elemente für die Replikation und Transkription von Coronaviren beinhaltet (Madhugiri et al. 2016, Yang & Leibowitz 2015). Diese sind in konservierten Sekundärstrukturelementen (*Stemloops*, *SL*) angeordnet, welche höchstwahrscheinlich von Bedeutung für RNA-RNA-/RNA-Protein-Interaktionen sind (Kang, H. et al. 2006, Li, L. et al. 2008, Madhugiri et al. 2016, Su et al. 2014, Yang & Leibowitz 2015). Es ist daher anzunehmen, dass sich Mutationen im Bereich der 5'UTR auf die Replikation und Transkription von Coronaviren auswirken und der Ersatz der 5'UTR<sub>MN</sub> durch die 5'UTR<sub>CV777</sub> daher den *Rescue* von recPEDVs ermöglichte.

Für Alphacoronaviren konnten die Strukturelemente SL1, 2, 4 und 5ABC gezeigt werden (Madhugiri et al. 2014, Madhugiri et al. 2018). Diese bestehen aus durch Basenpaarung stabilisierten Nukleotidsträngen (*stem*), welche über einen Bogen von Nukleotiden (*loop*)

miteinander verbunden sind (1.1.3, Abb. 3). Von den vier oben beschriebenen Nukleotidänderungen waren zwei an der Spitze von *Stemloops* lokalisiert und damit räumlich exponiert. Dabei handelt es sich um eine U-Insertion an Position 48 in der 5'UTR<sub>MN</sub>, welche in der Loopsequenz von SL2 zu finden ist, sowie um die Substitution von U an Position 99 durch C an der Spitze von SL4. Beide Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Da die anderen beiden Änderungen (G117A und C287U) nicht an der Spitze von *Stemloops* positioniert waren und keine Destabilisierung der Sekundärstruktur zur Folge hatten, wurden sie nicht weiter erforscht. Bei SL2 handelt es sich um die am meisten konservierte Struktur in der coronaviralen 5'UTR (Chen, S. C. & Olsthoorn 2010, Liu, P. et al. 2007) und für die Loopsequenz konnte eine Rolle in der RNA-Synthese von MHV gezeigt werden (Liu, P. et al. 2009). Ein recPEDV basierend auf der 5'UTR<sub>MN</sub> mit Deletion von U an Position 48 in SL2 konnte im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden und zeigte ähnliche Wachstumseigenschaften wie nach Substitution der gesamten 5'UTR-Sequenz. Die Vorhersage der Sekundärstruktur der 5'UTR<sub>MN</sub> zeigt keine Änderung von SL2, bis auf die Anzahl der Nukleotide in der Loopsequenz (4 bei MN, 3 bei CV777) (Huang et al. 2013). Madhugiri et al. konnten zeigen, dass Mutationen an Genomposition 45 oder 47 bei HCoV-229E zur Destabilisierung der Sekundärstruktur führen und Defekte in der Replikation verursachen. Die Loopsequenz ist dabei von großer Bedeutung, da kompensatorische Mutationen zur Wiederherstellung der Struktur immer noch in Wachstumsdefekten in Zellkultur resultieren (Madhugiri et al. 2018). Daher ist anzunehmen, dass die Insertion eines zusätzlichen Nukleotids an Position 48 in der PEDV-5'UTR auch Auswirkungen auf die Replikation *in vitro* hat.

Mutationen in SL4 werden meist toleriert, sodass ein intakter SL4 als vorteilhaft, jedoch nicht essentiell für die Replikation in Zellkultur betrachtet wird (Madhugiri et al. 2014, Yang et al. 2011). Ein Einfluss von SL4 auf die Synthese sgmRNAs wird vermutet (Madhugiri et al. 2014, Wu et al. 2006, Yang et al. 2011, Zuniga et al. 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Substitution von C an Position 99 durch T in SL4 der 5'UTR<sub>MN</sub> die Herstellung von recPEDVs ermöglicht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Sequenzkonservierung dieses Bereichs eine erhebliche Rolle für die coronavirale Replikation/Transkription spielt. Ähnliches wurde für SL1 gezeigt, auch hier wirken sich Änderungen konservierter Sequenzmotive negativ auf die Replikation aus (Li, L. et al. 2008, Madhugiri et al. 2014).

Bezüglich der in Genbank veröffentlichten Datenbanksequenz von PEDV MN stellt sich die Frage, ob die oben beschriebenen, von der 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenz abweichenden Mutationen auf Sequenzierungsfehler zurückzuführen sind oder der Realität entsprechen. Wie bereits beschrieben, werden häufig Sequenzierungsprobleme im Bereich der Genomenden

beobachtet, allerdings wurde die Sequenz der 5'UTR<sub>MN</sub> mit RACE-PCR bestimmt und erscheint daher vertrauenswürdig (Huang et al. 2013). Weitere nordamerikanische, hochvirulente Stämme zeigen die gleichen Nukleotidsequenzen wie MN an den untersuchten Positionen. Auch hier wurde die 5'UTR-Sequenz aus infizierten Tieren durch RACE-PCR bestimmt (Huang et al. 2013). Während bei den von Huang et al. sequenzierten Viren Daten zum Wachstum in Zellkultur fehlen, sind weitere Stämme (NPL2013, PC22A) sowohl *in vitro* kultivierbar als auch hochvirulent *in vivo* (Beall et al. 2016). Letztere beinhalten zwar an den oben beschriebenen Positionen in der 5'UTR die gleichen Nukleotide wie MN, zeigen allerdings teilweise von der MN-Sequenz abweichende Nukleotide an anderen Positionen, welche möglicherweise einen kompensatorischen Effekt auf die Replikation in Zellkultur haben könnten. Weiterhin führten die von Huang et al. beobachteten Nukleotidänderungen in der 5'UTR nordamerikanischer hochvirulenter Stämme zur der Annahme, dass diese Modifikationen am 5'-Genomende mit der Virulenz von PEDV assoziiert sind (Huang et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit jedoch zeigte sich ein recPEDV-MN, welches die 5'UTR-Sequenz des zellkulturadaptierten Stammes CV777 beinhaltet, hochvirulent. Somit bleibt ein Zusammenhang zwischen der 5'UTR-Sequenz und der Virulenz *in vivo* weiter offen.

#### **4.1.2 Effekt des Austausches von Aminosäuren in S<sub>MN</sub> auf die Herstellung rekombinanter PEDVs**

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss von S<sub>MN</sub> auf die Herstellung und die Zellkulturpropagation von recPEDVs untersucht. Dazu wurde ein rekombinantes Vacciniavirus (vrecPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-GFP) hergestellt, welches S<sub>MN</sub> sowie ein GFP-Reportergen und ein intaktes Gen 3 enthielt, da kein hemmender Einfluss von ORF3 auf den *Rescue* von recPEDVs beobachtet werden konnten. Außerdem beinhaltete das Virus die 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenz, da diese die Herstellung rekombinanter Viren mit S<sub>CV777</sub> zuließ. Ausgehend vom rekombinanten Vacciniavirus wurde recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-GFP-RNA hergestellt und zur Elektroporation verwendet. Es konnten jedoch keine recPEDVs nachgewiesen werden. Ein *Rescue* oder eine *In-vitro*-Kultivierung rekombinanter PEDVs mit der S<sub>MN</sub>-Datenbanksequenz war demzufolge nicht möglich.

Um Aminosäuren im S-Protein zu identifizieren, die essentiell für die Zellkulturpropagation von recPEDV sind, wurde die S<sub>MN</sub>-Aminosäuresequenz mit der zweier weiterer, US-amerikanischer PEDV-Stämme (NPL2013 und PC22A) verglichen, die ebenfalls aus Schweinen mit PED isoliert worden waren und in Zelllinien kultiviert werden konnten. Dieser Vergleich zeigte mehrere Aminosäureunterschiede in der S1-Untereinheit, wobei drei dieser Differenzen an exakt derselben Position (226, 375 und 486) in allen drei Sequenzen lokalisiert waren. An Aminosäureposition 226 enthält S<sub>MN</sub> ein Phenylalanin, während die

anderen S-Proteine dort Serin beinhalten (F226S). An Aminosäureposition 375 befindet sich in S<sub>MN</sub> Leucin, die anderen beiden Stämme enthalten hier jeweils ein Phenylalanin (L375F). Position 486 war in allen drei Stämmen unterschiedlich besetzt, S<sub>MN</sub> enthält dort Histidin, S<sub>NPL2013</sub> Threonin und S<sub>PC22A</sub> Prolin (H486P). Um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die *In-vitro*-Kultivierung von recPEDVs zu überprüfen, wurde ein rekombinantes Vacciniavirus generiert, welches zusätzlich zur 5'UTR<sub>CV777</sub>-Sequenz und dem GFP-Gen die S<sub>MN</sub>-Sequenz mit den Mutationen F226S, L375F und H486P besaß. Tatsächlich gelang es, rekombinante PEDVs basierend auf S<sub>MN</sub> mit den drei beschriebenen Mutationen herzustellen, sodass ein Einfluss dieser Aminosäuren auf den *Rescue* demonstriert werden konnte. Durch Generierung verschiedener rekombinanter Vaccinaviren mit Variierung der drei Mutationen konnte gezeigt werden, dass bereits die Kombinationen F226S + L375F und L375F + H486P für die erfolgreiche Herstellung von recPEDVs ausreichend waren. Eine Analyse des S-Proteins mehrerer Hundert PEDV-Stämme (Hanspeter Stalder, Institut für Virologie und Immunologie, Bern, Schweiz) ließ vermuten, dass es sich bei Zuordnung der Aminosäure Phenylalanin an Position 226 in S<sub>MN</sub> um einen Sequenzierungsfehler handelte, da Phenylalanin nur bei MN beobachtet wurde. Gleiches gilt für Position 486, hier besitzt außer MN nur ein weiteres Isolat Histidin, der Großteil der Viren enthält hier Prolin. An Position 375 konnte Leucin dagegen bei über 700 Stämmen gezeigt werden, dennoch besitzen PEDVs, die nachweislich *in vitro* kultivierbar sind, an dieser Position Phenylalanin. Es konnte allerdings kein rekombinantes Virus, welches nur die Modifikationen F226S und H486P enthält, hergestellt werden. Daher beruhte der Misserfolg des *Rescues* möglicherweise nicht nur auf Sequenzierungsfehlern, sondern steht in Zusammenhang mit der Bedeutung des S-Proteins für den Eintritt in die Zielzelle und Zellfusion.

Als eine denkbare Erklärung für den erfolgreichen *Rescue* von recPEDV mit F226S, L375F und H486P kommt dabei ein Einfluss der Aminosäureänderungen auf die Bindung an zelluläre Rezeptoren in Frage, da diese drei Aminosäurepositionen in der für die Rezeptorbindung verantwortlichen S1-Untereinheit lokalisiert sind. Einem Vergleich mit Strukturdaten für TGEV (Reguera et al. 2012) zufolge liegen die Aminosäuren an Positionen 226, 375, 486 außerhalb der Rezeptorbindungsdomäne für pAPN. Auch nach einem Modell für PEDV Stamm GDU, welches die Rezeptorbindungsaktivität der S1<sup>B</sup>-Domäne zuordnet (aa 510-640) (Li, C. et al. 2017), liegen die Positionen 375 und 486 nicht direkt innerhalb dieses Bereichs, sind jedoch benachbart. Für S1<sup>B</sup> von PEDV wurde eine Interaktion mit pAPN vermutet (Deng, F. et al. 2016), neuere Studien widerlegen allerdings die Bedeutung von pAPN als Rezeptor für PEDV (Ji et al. 2018, Li, W. et al. 2017, Shirato et al. 2016). Dagegen spricht ebenfalls die Permissivität von Vero-Zellen, die kein pAPN besitzen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Aminosäuren an Position 375 und 486 mit einem,

bislang noch unbekannten, Rezeptor interagieren und somit den Eintritt in die Zelle ermöglichen. Einem Strukturmodell der S1-Untereinheit, basierend auf einem Modell von HCoV-NL63 (Walls et al. 2016b), entsprechend befindet sich die Aminosäure an Position 486 an der Oberfläche des S-Proteins, sodass eine eventuelle Rezeptor-Interaktion vorstellbar wäre. Die Aminosäure an Position 226 hingegen liegt auf einem Strukturmodell in räumlicher Nähe zur S1<sup>0</sup>-Domäne. Für diese Domäne wird eine Interaktion mit zellulären Sialinsäuren vermutet (Deng, F. et al. 2016, Hou et al. 2017, Krempl & Herrler 2001, Krempl et al. 1997, Li, W. et al. 2016, Liu, C. et al. 2015, Reguera et al. 2012, Shahwan et al. 2013). Auch die Aminosäure an Position 226 liegt an der Oberfläche des S-Proteins, sodass eine Wechselwirkung mit eventuellen Rezeptoren oder Korezeptoren denkbar ist und möglicherweise die Infektion von Zellen beeinflusst.

Als weitere Hypothese für die Rolle der Aminosäuren 226, 375 und 486 im S-Protein bei der Herstellung und *In-vitro*-Kultivierung von recPEDVs kommt ein Einfluss auf die proteolytische Prozessierung des S-Proteins in Betracht. Diese ist für eine Aktivierung der S-Untereinheiten notwendig und kann im Fall von PEDV durch Trypsin ausgelöst werden (Li, W. et al. 2016, Millet & Whittaker 2015, Park, J. E. et al. 2011, Shirato et al. 2011, Wicht et al. 2014). Es wird vermutet, dass die trypsininduzierte Spaltung am Übergang von der S1- zur S2-Untereinheit oder an einer weiteren, innerhalb der S2-Untereinheit gelegenen Spaltstelle stattfindet (Li, W. et al. 2015, Sun, M. et al. 2017, Wicht et al. 2014). Der genaue Hintergrund ist allerdings noch unbekannt. Es ist somit nicht auszuschließen, dass durch die Modifikation der Aminosäuren an Position 226 und 375 oder 375 und 486 bestimmte Spaltstellen für zelluläre Proteasen entstehen, die eine Aktivierung des S-Proteins mit nachfolgender Infektion der Kulturzellen zur Folge hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mutationen L375F + H486P für die Generierung von recPEDVs mit S<sub>MN</sub> beibehalten, da mit dieser Kombination höhere Virustiter erreicht wurden als nach Einführung von F226S + L375F.

## 4.2 Charakterisierung von recPEDV-MN *in vivo*

Um zu überprüfen, ob das in dieser Studie generierte recPEDV-MN in der Lage war, PED auszulösen, wurden SPF-Ferkel im Alter von 7 Tagen infiziert. Dazu wurde ein recPEDV-MN, welches die für einen erfolgreichen *Rescue* benötigte 5'UTR<sub>CV777</sub> sowie die Mutationen L375F + H486P in S<sub>MN</sub> besitzt, hergestellt (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN</sub>-L375F, H486P). Bereits 12 Stunden nach der Infektion zeigten die Ferkel Vomitus und Diarrhö, ähnlich wie für andere hochvirulente PEDV Stämme beschrieben (Chen, Q. et al. 2016, Jung et al. 2015, Li, W. et al. 2012, Lin et al. 2016, Stevenson et al. 2013). Am vierten Tag p.i. waren einige Tiere stark dehydriert und abgemagert, sodass sie euthanasiert wurden. Die makroskopisch-



pathologische Untersuchung zeigte für PED typische Veränderungen (Chen, Q. et al. 2016, Jung et al. 2015, Li, W. et al. 2012, Lin et al. 2016, Stevenson et al. 2013). In der histologischen Untersuchung von Organproben waren Abweichungen nur im Bereich des Dünndarms festzustellen. Eine Längenmessung der jejunalen Villi demonstrierte eine charakteristische Atrophie und Verkürzung der Darmzotten, die vielfach nach Infektionen mit hochvirulenten PEDV-Stämmen beobachtet wurde (Jung et al. 2015, Lin et al. 2016). Die durch qRT-PCR ermittelte oronasale und fäkale Virusausscheidung stieg drastisch an und erreichte, übereinstimmend mit dem klinischen Bild, ihr Maximum am Tag 3 p.i. PEDV-RNA konnte mit qRT-PCR in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden. Mit immunhistochemischen Verfahren konnte PEDV-Antigen allerdings nur in Dünndarmabschnitten demonstriert werden. Der Nachweis von PEDV-RNA in den anderen Organen, in welchen immunhistochemisch kein PEDV-Antigen nachweisbar war, ist vermutlich nicht als Zeichen einer produktiven Infektion zu interpretieren. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Virusreste, die im Zuge der Virämie in die jeweiligen Organe gelangten. Eine Infektion des Colons, wie in einigen Studien beobachtet (De Bouck et al. 1981, Jung et al. 2014), konnte nicht gezeigt werden. Die in einer Veröffentlichung beschriebene und als Kennzeichen hochvirulenter Stämme interpretierte Infektion von Organen des Respirationstraktes (Park, J. E. & Shin 2014) konnte nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein (Chen, Q. et al. 2016, Jung et al. 2015, Jung et al. 2014, Lin et al. 2017, Niederwerder et al. 2016) und lässt vermuten, dass es sich bei PED primär um eine Infektion des Gastrointestinaltraktes handelt und andere Organsysteme nicht betroffen sind.

Die Übertragbarkeit von recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> wurde durch Einstellung zweier Kontakttiere 48 Stunden p.i. überprüft. Die Sentineltiere zeigten ähnliche Symptome wie infizierte Ferkel. Allerdings war eine schnellere und ausgeprägtere Klinik erkennbar, die in Korrelation mit den pathologischen Befunden stand. Dies lässt sich durch die hohe Virusausscheidung mit den Fäzes infizierter Tiere und damit größere Infektionsdosis der Kontakttiere erklären. Nicht auszuschließen ist auch das Auftreten von Mutationen nach der ersten Tierpassage, welche eine Adaptation an den Wirt und eine höhere Virulenz bedingen. Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte recPEDV-MN ist somit durch Kontakt übertragbar, ähnlich wie es auch für ein anderes rekombinantes PEDV gezeigt werden konnte (Beall et al. 2016).

Im Vergleich mit dem ebenfalls im Tierversuch eingesetzten US-Stamm NPL2013 erscheint das rekombinante Virus geringgradig weniger virulent.

#### 4.2.1 Einfluss des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV *in vivo*

Zur Untersuchung des Einflusses des S-Proteins auf die Virulenz von PEDV *in vivo* wurden SPF-Ferkel mit einem rekombinanten Virus, das neben der 5'UTR<sub>CV777</sub> das S-Gen des zellkulturadaptierten Stammes CV777 beinhaltet (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub>), infiziert. Die Ferkel zeigten im gesamten Versuchsverlauf keine klinischen Anzeichen von PED, welche ebenfalls weder bei der makroskopischen- und histopathologischen Untersuchung festzustellen waren. Mittels Immunhistochemie ließ sich kein PEDV-Antigen demonstrieren. Allerdings war ab Tag 4 p.i. eine geringgradige Virämie feststellbar und PEDV-RNA konnte in einigen Organen nachgewiesen werden. Die Virussausscheidung im Kot stieg ab Tag 5 p.i. signifikant an, blieb jedoch deutlich unter den für recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> ermittelten Werten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das recPEDV mit S<sub>CV777</sub> nicht in der Lage war, klinische PED auszulösen und sich im Tierversuch komplett attenuiert darstellte. Der Anstieg in der Virussausscheidung ab Tag 5 p.i. deutet allerdings auf eine Infektion und Replikation des rekombinanten Virus im Tier hin. Die Frage, ob recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>CV777</sub> nach einer deutlich längeren Inkubationszeit in der Lage ist, PED-Symptome auszulösen, bleibt offen, da der Tierversuch am 7. Tag p.i. terminiert wurde. Da der alleinige Austausch des S-Gens in einer Attenuierung von PEDV resultierte, kann das S-Gen als ein Virulenzfaktor angesehen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit anderen klinischen Studien. Hou et al. konnten zeigen, dass ein rekombinantes PEDV mit Deletion von 197 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne des S-Gens nur eine milde Klinik ohne Mortalität verursachte (Hou et al. 2017). Ein auf einem hochvirulenten PEDV-Isolat basierendes rekombinantes Virus, welches das S-Gen eines schwachvirulenten Stammes enthielt, war ebenso avirulent (Wang, D. et al. 2018). Auch im Feld isolierte Varianten mit weitreichenden Deletionen im S-Gen verursachen meist nur eine milde PED-Symptomatik (Hou et al. 2017, Lin et al. 2016, Murakami et al. 2015, Park, S. et al. 2014, Suzuki et al. 2016, Zhang, J. et al. 2018).

Eine mögliche Erklärung für die niedrigere Virulenz von PEDVs mit Deletionen im S-Gen besteht in einem veränderten Bindungsverhalten an Glykoproteine, da die hier gefundenen Veränderungen im S-Protein mit einem Verlust der Bindungskapazität von Sialinsäuren assoziiert sind (Hou et al. 2017). Das Gleiche gilt für S-INDEL-Stämme, welche bestimmte Insertionen und Deletionen in der S1<sup>0</sup>-Domäne enthalten und meist schwachvirulent sind (Chen, Q. et al. 2016, Lee, C. 2015, Leidenberger et al. 2017, Lin et al. 2016, Vlasova et al. 2014, Wang, L. et al. 2014, Wang, L. et al. 2016). Da diese Modifikationen ebenfalls in den klassischen Stämmen, z. B. CV777 zu finden sind, ist anzunehmen, dass die Fähigkeit zur Bindung von Sialinsäuren, die für hochvirulente Stämme gezeigt werden konnte, die Virulenz von PEDV beeinflusst (Deng, F. et al. 2016, Hou et al. 2017, Li, W. et al. 2016). Im Falle des

verwandten Alphacoronavirus TGEV führte der Verlust der S1<sup>0</sup>-Domäne, welche die Sialinsäurebindungsaktivität beinhaltet, zu einem veränderten Gewebstropismus. Das resultierende PRCV war nicht mehr in der Lage, Enterozyten zu infizieren und verbreitete sich stattdessen im Respirationstrakt. Änderungen in der Gewebespezifität konnten für PEDV jedoch nicht bestätigt werden (Hou et al. 2017). Allerdings ist es möglich, dass die Fähigkeit, Sialinsäuren zu binden, einen Selektionsvorteil in der Muzinschicht des Darmlumens bildet, durch welchen Viren mit höherer Sialinsäurebindungskapazität leichter in Kontakt mit Zielzellen kommen und die Infektion erleichtert wird.

Auch wenn in dieser Arbeit die Bedeutung des PEDV-S-Gens als Virulenzfaktor gezeigt werden konnte, spielen wahrscheinlich noch weitere Faktoren eine Rolle für die Pathogenese der PED, da die alleinige Einführung des S-Gens eines hochvirulenten Stammes in ein schwachvirulentes rekombinantes Virus nicht zu einem virulenten Phänotyp führt (Hou et al. 2017).

#### **4.2.2 Einfluss von ORF3 auf die Virulenz von PEDV *in vivo***

Die Bedeutung von Gen 3 für die Virulenz von PEDV wurde in einem weiteren Tierversuch evaluiert. Dazu wurden SPF-Ferkel mit einem recPEDV-MN, welches neben 5'UTR<sub>CV777</sub> und S<sub>MN</sub> mit den Mutationen L375F + H486P eine Deletion in ORF3 enthält (recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub>-3<sub>CV777</sub>), infiziert. Die mit dem recPEDV-MN mit Deletion in ORF3 infizierten Tiere zeigten bereits 12 Stunden p.i. ebenso heftige Symptome wie eine mit recPEDV-MN-5'UTR<sub>CV777</sub>-S<sub>MN-L375F, H486P</sub> mit intaktem Gen 3 infizierte Kontrollgruppe. In der pathologischen und histopathologischen Untersuchung wurden die für PED typischen Befunde erhoben. Die Virusausscheidung im Kot befand sich bereits am ersten Tag p.i. auf einem ähnlich hohen Niveau wie nach Infektion mit recPEDV-MN mit intaktem Gen 3. Die Übertragbarkeit des rekombinanten Virus konnte mithilfe von Kontakttieren, die 12 Stunden nach der Einstellung erste klinische Symptome zeigten, demonstriert werden.

Die Rolle von ORF3 in der Pathogenese der PED konnte bislang noch nicht geklärt werden. Es existieren allerdings einige Hypothesen bezüglich der Funktion des akzessorischen Proteins 3. Zum einen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es sich bei diesem um einen Ionenkanal handelt (Wang, K. et al. 2012). Die in recPEDV-MN eingeführte Deletion von 49 Nukleotiden in Gen 3 entstammt dem zellkulturadaptierten Virus CV777 und resultiert in einem trunkierten Genprodukt, welches in Zellkultur keine Ionenkanalaktivität besitzt (Wang, K. et al. 2012). Ob das akzessorische Protein 3 auch *in vivo* eine Ionenkanalfunktion erfüllt und welche Bedeutung dies für die Pathogenese der PED hat, bleibt jedoch offen.

Bezüglich der Funktion von Gen 3 *in vivo* wurde einerseits ein Einfluss auf die Virulenz von PEDV vermutet. Eine Deletion in Gen 3 wurde vielfach nach Zellkulturadaptation beobachtet und mit einer Attenuierung in Zusammenhang gebracht (Lee, S. et al. 2017, Park, S. J. et al. 2012, Park, S. J. et al. 2008). Ein Beweis dieser Hypothese mithilfe reverser Genetik stand allerdings noch aus. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate zeigen, dass eine Deletion in ORF3 nicht zu einer Attenuierung von PEDV *in vivo* führte und Gen 3 daher keine Rolle als Virulenzfaktor spielt. Studien anderer Forschungsgruppen zeigen übereinstimmende Ergebnisse. So konnte ein rekombinantes PEDV, in welchem ORF3 durch ein Reportergen ersetzt wurde, ebenso wie das Ausgangsvirus, schwerwiegende PED auslösen (Beall et al. 2016).

Andererseits ist ein Einfluss von Gen 3 auf den Gewebstropismus von PEDV denkbar, wie auch für einige andere coronavirale akzessorische Proteine vermutet wird (Dedeurwaerder et al. 2013). In der hier beschriebenen Studie konnten jedoch keine Differenzen im Tropismus von Viren mit intaktem ORF3 oder mit Deletion in Gen 3 festgestellt werden. Beide recPEDVs konnten mit immunhistochemischen Verfahren nur im Dünndarm infizierter Tiere nachgewiesen werden. Die Funktion von Gen 3 *in vivo* bleibt somit weiterhin unbekannt.

### **4.3 Verwendungsmöglichkeiten für das revers-genetische System zur Herstellung von recPEDV-MN**

#### **4.3.1 Identifizierung von biologischen Markern und Genen mit Auswirkung auf die Virulenz von PEDV**

Eine Anwendungsmöglichkeit für das in dieser Arbeit etablierte revers-genetische System besteht in der Identifizierung biologischer Marker, die eine Unterscheidung von hoch- und schwachvirulenten Stämmen zulassen. Darunter sind bestimmte, konservierte Sequenzmotive zu verstehen, die in der jeweiligen Form nur bei Viren mit hoher oder schwacher Virulenz zu finden sind. Ein Beispiel für eine solche konservierte Nukleotidsequenz bilden die für S-INDEL-Stämme beschriebenen, konservierten Insertionen und Deletionen in der S1-Untereinheit (Lee, C. 2015, Li, C. et al. 2017, Lin et al. 2016, Vlasova et al. 2014, Wang, L. et al. 2014, Wang, L. et al. 2016). Basierend auf Sequenzanalysen konnten Genom motive in ORF1b und S-Gen identifiziert werden, die exklusiv bei S-INDEL-Stämmen (Yamamoto et al. 2016) oder klassischen Varianten auftreten (Chen, F. et al. 2016). Mittels reverser Genetik ist es möglich, ein solches Motiv in recPEDV-MN einzuführen und die Virulenz des rekombinanten Virus *in vivo* zu charakterisieren. Nach Identifizierung von biologischen Markern besteht der nächste Schritt in der Etablierung neuer diagnostischer Verfahren, z. B. qRT-PCR-Ansätze, die eine

Unterscheidung zwischen hoch- und schwachvirulenten Stämmen zulassen. Zukünftig ist dadurch eine Reduktion von Tierversuchen zur Untersuchung der Virulenz von PEDV-Stämmen möglich.

Desweiteren eignet sich das revers-genetische System zur Identifizierung von Genen, die einen Einfluss auf die Virulenz haben (Virulenzfaktoren). Ein denkbarer Ansatz besteht darin, bestimmte Gene in recPEDV-MN durch Sequenzen von schwachvirulenten Stämmen zu ersetzen und den Einfluss auf die Virulenz *in vivo* zu untersuchen. Für das S-Gen konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass es sich um einen Virulenzfaktor handelt, während ORF3 keinen Einfluss auf die Virulenz hat. Andere Studien lassen eine Bedeutung von nsp3 als Virulenzfaktor vermuten. Mithilfe von Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass attenuierte Impfstämme in dieser Genomregion besonders viele Mutationen im Vergleich zu den hochvirulenten Ausgangsviren enthalten (Park, S. J. et al. 2012, Zuniga et al. 2016). Diese Hypothese könnte durch Austausch von nsp3 in recPEDV-MN durch die entsprechende Sequenz eines schwachvirulenten Virus überprüft werden. Für weitere nsps wird ein hemmender Einfluss auf das Immunsystem angenommen (Zhang, Q. & Yoo 2016, Zuniga et al. 2016). Die reverse Genetik in Kombination mit Tierversuchen bietet eine elegante Möglichkeit, die Bedeutung dieser nsps als Virulenzfaktoren näher zu untersuchen.

#### **4.3.2 Einsatz reverser Genetik zur Vakzineherstellung**

Klassischerweise wurden zur aktiven Immunisierung gegen PEDV attenuierte Lebendvakzinen eingesetzt, welche eine stärkere Immunität induzieren als Inaktivatvakzinen (Chattha et al. 2015, Langel et al. 2016, Song, D. & Park 2012). Erstere besaßen allerdings nur eine geringe Kreuzreaktivität gegen die neu entstandenen hochvirulenten Stämme (Kim et al. 2015, Lin et al. 2015, Song, D. et al. 2015, Wang, X. et al. 2016). Verstärkte Anstrengungen in den letzten Jahren führten zur Entwicklung von Inaktivatvakzinen gegen hochvirulente Varianten, diese bieten jedoch keinen 100%igen Schutz (Crawford et al. 2016, Langel et al. 2016). Weitere Ansätze basieren auf dem Einsatz attenuierter S-INDEL-Stämme als Lebendvakzinen, welche sich lediglich als teilweise protektiv gegen hochvirulente PEDVs erwiesen haben (Annamalai et al. 2017, Lin et al. 2016, Opriessnig et al. 2017). Mithilfe des revers-genetischen Systems für PEDV ist es möglich, Virulenzfaktoren zu identifizieren und diese gezielt zu modifizieren, um eine Attenuierung von Viren bei gleichbleibender Immunogenität zu erreichen und so effektivere Lebendvakzinen herstellen zu können (Zuniga et al. 2016).

Desweiteren ist es denkbar, die Reihenfolge von Genen, die Strukturproteine kodieren, zu vertauschen, wie bereits für MHV gezeigt werden konnte (De Haan et al. 2002). Dieser Ansatz führt einerseits möglicherweise zu einer Attenuierung *in vivo*, wie für ein anderes

RNA-Virus (Vesikuläre Stomatitis Virus) beschrieben (Flanagan et al. 2001, Wertz et al. 1998). Andererseits lässt sich auf diese Weise das Risiko der Rekombination mit hochvirulenten Feldstämmen, welches beim Einsatz von Lebendvakzinen kritisch hinterfragt werden muss (Lin et al. 2016, Zuniga et al. 2016), deutlich verringern (De Haan et al. 2002).

Ein weiterer Ansatz zur Herstellung attenuierter Lebendvakzinen, der typischerweise in Asien verfolgt wurde, besteht in der fortlaufenden Passagierung von PEDV in Zellkultur (Kweon et al. 1999, Langel et al. 2016, Lee, S. et al. 2017, Song, D. & Park 2012, Song, D. S. et al. 2007). Für einen US-Stamm konnte gezeigt werden, dass das Virus nach 100 Zellkulturpassagen attenuiert war und hohe Antikörpertiter induzierte (Lin et al. 2017). Analog zu diesem Ansatz ist es vorstellbar, recPEDV-MN in Zellen zu passagieren und die Virulenz nach bestimmten Passagen *in vivo* zu charakterisieren. Durch Sequenzierung bestimmte Mutationen im zellkulturadaptierten Virus könnten anschließend in recPEDV-MN eingeführt und im Tierversuch auf Attenuierung geprüft werden. Die eingeführten Mutationen sollten außerhalb des S-Gens, liegen, da Letzteres wichtige Epitope zur Induktion neutralisierender Antikörper beinhaltet und Mutationen im S-Gen den Schutz durch kreuzreagierende Antikörper verringern (Chang et al. 2002, Ge et al. 2012, Kang, T. J. et al. 2005, Li, C. et al. 2017, Lin et al. 2015, Lin et al. 2016, Oszvald et al. 2007, Song, D. et al. 2015, Sun, D. et al. 2008, Sun, R. et al. 2014, Wang, L. et al. 2016).

## 5 Zusammenfassung

Die porcine epidemische Diarrhö (PED) ist eine weltweit auftretende, wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung des Schweines und wird durch das Virus der porcinen epidemischen Diarrhö (PEDV) verursacht. Das Auftreten hochvirulenter Stämme in Asien und den USA mit Mortalitätsraten um 100 % bei Saugferkeln hat in den letzten Jahren zu großen ökonomischen Verlusten in Schweinebetrieben geführt. Um eine Differenzierung dieser hochvirulenten von klassischen oder schwachvirulenten Stämmen zu ermöglichen und effiziente Vakzinen herstellen zu können, ist die Identifizierung von Virulenzfaktoren und biologischer Marker der unterschiedlichen Varianten notwendig. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit ein revers-genetisches System für ein hochvirulentes US-Feldisolat etabliert. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1) Zur Herstellung eines infektiösen Klon wurde das komplette Genom von PEDV Minnesota (MN), basierend auf der Datenbanksequenz, in überlappenden cDNA-Fragmenten synthetisiert und in das Vacciniavirusgenom als Vektor eingeführt.
- 2) Die Generierung rekombinanter Viren auf Basis der kompletten PEDV-MN-Datenbanksequenz war nicht erfolgreich. Durch Mutationen in der 5'UTR und dem S-Gen konnten essentielle Nukleotide bzw. Aminosäuren im PEDV-MN-Genom identifiziert werden, die einen erfolgreichen *Rescue* und *In-vitro*-Kultivierung ermöglichten. Somit wurde ein geeignetes System zur Herstellung rekombinanter PEDVs etabliert.
- 3) Durch Infektion von neugeborenen Ferkeln wurde anschließend evaluiert, ob das, ausgehend vom cDNA-Klon hergestellte, recPEDV-MN in der Lage war, PED auszulösen. Außerdem wurde der Einfluss des S-Proteins auf die Virulenz *in vivo* untersucht. Dazu wurden Ferkel mit einem recPEDV-MN, bei dem S<sub>MN</sub> durch das S-Gen des zellkulturadaptierten Stammes CV777 ersetzt worden war, infiziert.
- 4) In einem weiteren Tierversuch wurde die Rolle von ORF3 in der Virulenz von PEDV untersucht. Zu diesem Zweck erhielten SPF-Ferkel recPEDV-MN mit einer Deletion in ORF3, die in einem trunkierten Genprodukt resultiert, als Inokulum.

Die Ergebnisse der Tierversuche zeigten, dass recPEDV-MN mit Modifikationen in der 5'UTR und dem S-Gen in der Lage war, PED mit schweren klinischen Symptomen auszulösen. Weiterhin resultierte der Austausch von S<sub>MN</sub> durch S<sub>CV777</sub> in einer Attenuierung von recPEDV. Die Zerstörung von ORF3 führte dagegen nicht zu einer Attenuierung von recPEDV. Daher spielt Gen 3 keine Rolle für die Virulenz *in vivo*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das im Rahmen dieser Arbeit etablierte revers-genetische System erfolgreich zur Identifizierung von Virulenzfaktoren von PEDV eingesetzt werden kann.



## 6 Summary

Porcine epidemic diarrhea (PED) represents an economically important disease of swine worldwide, and is caused by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The emergence of highly virulent strains in Asia and the USA, inducing severe disease in newborn piglets with mortality rates up to 100%, caused high economic losses for the swine industry. In order to differentiate between these high-pathogenic and classical or low-pathogenic strains and to generate effective vaccines, identification of biological markers and virulence factors is necessary. To this end, a vaccinia virus-based reverse genetic system for a highly virulent US field isolate was established in this study. The following results were obtained:

- 1) For the generation of an infectious clone, the entire genome of PEDV Minnesota (MN), based on the databank sequence, was synthesized as overlapping cDNA fragments and introduced into vaccinia virus genome, which serves as a vector.
- 2) First experiments showed that the infectious clone based on the original databank sequence did not allow the rescue of PEDVs. Mutations in 5'UTR and S gene enabled the identification of nucleotides/amino acids in the PEDV genome, which were essential for successful rescue and *in-vitro*-cultivation. Thus, a suitable reverse genetic system to generate recPEDVs was established.
- 3) In order to investigate whether the recombinant PEDV MN based on the cDNA clone was able to induce PED, newborn piglets were infected. To elucidate the role of the S protein in PEDV virulence, piglets were inoculated with another recPEDV-MN, in which S<sub>MN</sub> was replaced by the S gene of the cell culture adapted strain CV777.
- 4) A second animal experiment was performed to investigate the role of ORF3 in PEDV virulence. For this purpose, piglets were infected with recPEDV-MN containing a deletion in ORF3, which leads to a truncated gene product.

The results of the animal experiments showed that recPEDV-MN with modifications in 5'UTR and S gene was able to induce a severe form of PED. Furthermore, substitution of S<sub>MN</sub> by S<sub>CV777</sub> attenuated recPEDV *in vivo*. In contrast, deletion in ORF3 did not lead to attenuation of the virus, suggesting that gene 3 has no impact on PEDV virulence *in vivo*.

In summary, these findings demonstrate that the reverse genetic system established in this study can successfully be used to identify virulence factors of PEDV.

## 7 Literaturverzeichnis

1. AKIMKIN, V., BEER, M., BLOME, S., HANKE, D., HOPER, D., JENCKEL, M. & POHLMANN, A. (2016). New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis* 22(7): 1314-1315.
2. ALMAZAN, F., GALAN, C. & ENJUANES, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* 78(22): 12683-12688.
3. ALMAZAN, F., GONZALEZ, J. M., PENZES, Z., IZETA, A., CALVO, E., PLANA-DURAN, J. & ENJUANES, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5516–5521.
4. ALONSO, C., GOEDE, D. P., MORRISON, R. B., DAVIES, P. R., ROVIRA, A., MARTHALER, D. G. & TORREMORELL, M. (2014). Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res* 45: 73.
5. ANNAMALAI, T., LIN, C. M., GAO, X., LIU, X., LU, Z., SAIF, L. J. & WANG, Q. (2017). Cross protective immune responses in nursing piglets infected with a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus strain and challenged with an original US PEDV strain. *Vet Res* 48(1): 61.
6. BARANOV, P. V., HENDERSON, C. M., ANDERSON, C. B., GESTELAND, R. F., ATKINS, J. F. & HOWARD, M. T. (2005). Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology* 332(2): 498-510.
7. BARCENA, M., OOSTERGETEL, G. T., BARTELINK, W., FAAS, F. G., VERKLEIJ, A., ROTTIER, P. J., KOSTER, A. J. & BOSCH, B. J. (2009). Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(2): 582-587.
8. BEALL, A., YOUNT, B., LIN, C. M., HOU, Y., WANG, Q., SAIF, L. & BARIC, R. (2016). Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A. *MBio* 7(1): e01451-01415.
9. BELOUZARD, S., MILLET, J. K., LICITRA, B. N. & WHITTAKER, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4(6): 1011-1033.
10. BENBACER, L., KUT, E., BESNARDEAU, L., LAUDE, H. & DELMAS, B. (1997). Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 71(1): 734–737.

11. BONIOTTI, M. B., PAPETTI, A., LAVAZZA, A., ALBORALI, G., SOZZI, E., CHIAPPONI, C., FACCINI, S., BONILAUDI, P., CORDIOLI, P. & MARTHALER, D. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 22(1): 83-87.
12. BOSCH, B. J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C. A. M. & ROTTIER, P. J. M. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology* 77(16): 8801-8811.
13. BRIERLEY, I., DIGARD, P. & INGLIS, S. C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57(4): 537-547.
14. BUDZILOWICZ, C. J., WILCZYNSKI, S. P. & WEISS, S. R. (1985). Three intergenic regions of coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 genome RNA contain a common nucleotide sequence that is homologous to the 3' end of the viral mRNA leader sequence. *J Virol* 53(3): 834-840.
15. BURKARD, C., VERHEIJE, M. H., WICHT, O., VAN KASTEREN, S. I., VAN KUPPEVELD, F. J., HAAGMANS, B. L., PELKMANS, L., ROTTIER, P. J., BOSCH, B. J. & DE HAAN, C. A. (2014). Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog* 10(11): e1004502.
16. CARVAJAL, A., LANZA, I., DIEGO, R., RUBIO, P. & CARMENES, P. (1995). Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J Vet Diagn Invest* 7(1): 60-64.
17. CASAIS, R., THIEL, V., SIDDELL, S. G., CAVANAGH, D. & BRITTON, P. (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 75(24): 12359-12369.
18. CHAE, C., KIM, O., CHOI, C., MIN, K., CHO, W. S., KIM, J. & TAI, J. H. (2000). Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet Rec* 147(21): 606-608.
19. CHANG, S. H., BAE, J. L., KANG, T. J., KIM, J., CHUNG, G. H., LIM, C. W., LAUDE, H., YANG, M. S. & JANG, Y. S. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 14(2): 295-299.
20. CHASEY, D. & CARTWRIGHT, S. F. (1978). Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res Vet Sci* 25(2): 255-256.

21. CHATTHA, K. S., ROTH, J. A. & SAIF, L. J. (2015). Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annu Rev Anim Biosci* 3: 375-395.
22. CHEN, F., KU, X., LI, Z., MEMON, A. M., YE, S., ZHU, Y., ZHOU, C., YAO, L., MENG, X. & HE, Q. (2016). Genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in Chinese mainland, revealing genetic markers of classical and variant virulent parental/attenuated strains. *Gene* 588(1): 95-102.
23. CHEN, J., WANG, C., SHI, H., QIU, H., LIU, S., CHEN, X., ZHANG, Z. & FENG, L. (2010). Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch Virol* 155(9): 1471-1476.
24. CHEN, J. F., SUN, D. B., WANG, C. B., SHI, H. Y., CUI, X. C., LIU, S. W., QIU, H. J. & FENG, L. (2008). Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes* 36(2): 355-364.
25. CHEN, Q., GAUGER, P. C., STAFNE, M. R., THOMAS, J. T., MADSON, D. M., HUANG, H., ZHENG, Y., LI, G. & ZHANG, J. (2016). Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. *J Gen Virol* 97(5): 1107-1121.
26. CHEN, Q., LI, G., STASKO, J., THOMAS, J. T., STENSLAND, W. R., PILLATZKI, A. E., GAUGER, P. C., SCHWARTZ, K. J., MADSON, D., YOON, K. J., STEVENSON, G. W., BURROUGH, E. R., HARMON, K. M., MAIN, R. G. & ZHANG, J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol* 52(1): 234-243.
27. CHEN, S. C. & OLSTHOORN, R. C. (2010). Group-specific structural features of the 5'-proximal sequences of coronavirus genomic RNAs. *Virology* 401(1): 29-41.
28. CHEUN-AROM, T., TEMEEYASEN, G., SRIJANGWAD, A., TRIPIPAT, T., SANGMALEE, S., VUI, D. T., CHUANASA, T., TANTITUVANONT, A. & NILUBOL, D. (2015). Complete genome sequences of two genetically distinct variants of porcine epidemic diarrhea virus in the eastern region of Thailand. *Genome Announc* 3(3).
29. CHIOU, H. Y., HUANG, Y. L., DENG, M. C., CHANG, C. Y., JENG, C. R., TSAI, P. S., YANG, C., PANG, V. F. & CHANG, H. W. (2017). Phylogenetic analysis of the spike (S) gene of the new variants of porcine epidemic diarrhoea virus in Taiwan. *Transbound Emerg Dis* 64(1): 157-166.
30. COLEY, S. E., LAVI, E., SAWICKI, S. G., FU, L., SCHELLE, B., KARL, N., SIDDELL, S. G. & THIEL, V. (2005). Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol* 79(5): 3097-3106.

- 31. COLLIN, E. A., ANBALAGAN, S., OKDA, F., BATMAN, R., NELSON, E. & HAUSE, B. M. (2015).** An inactivated vaccine made from a U.S. field isolate of porcine epidemic disease virus is immunogenic in pigs as demonstrated by a dose-titration. *BMC Vet Res* 11: 62.
- 32. CORNELISSEN, L., WIERDA, C., VAN DER MEER, F., HERREWEGH, A., HORZINEK, M., EGBERINK, H. & DE GROOT, R. (1997).** Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *J Virol* 71(7): 5277–5286.
- 33. CRAWFORD, K., LAGER, K. M., KULSHRESHTHA, V., MILLER, L. C. & FAABERG, K. S. (2016).** Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada. *Virus Res* 226: 108-116.
- 34. DASTJERDI, A., CARR, J., ELLIS, R. J., STEINBACH, F. & WILLIAMSON, S. (2015).** Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* 21(12): 2235-2237.
- 35. DE BOUCK, P. & Pensaert, M. (1980).** Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 41(2): 219-223.
- 36. DE BOUCK, P., Pensaert, M. & Coussement, W. (1981).** The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet Microbiol* 6: 157-165.
- 37. DE HAAN, C. A. & ROTTIER, P. (2005).** Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 64: 165-230.
- 38. DE HAAN, C. A., VOLDERS, H., KOETZNER, C. A., MASTERS, P. S. & ROTTIER, P. (2002).** Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol* 76(24): 12491–12502.
- 39. DEA, S., VAILLANCOURT, Y. J., ELAZHARY, Y. & MARTINEAU, G. P. (1985).** An outbreak of diarrhea in piglets caused by a coronavirus antigenically distinct from transmissible gastroenteritis virus. *Can. Vet. J.*(26): 108-111.
- 40. DEDEURWAERDER, A., DESMARETS, L. M., OLYSLAEGERS, D. A., VERMEULEN, B. L., DEWERCHIN, H. L. & NAUWYNCK, H. J. (2013).** The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol* 162(2-4): 447-455.
- 41. DEE, S., CLEMENT, T., SCHELKOPF, A., NEREM, J., KNUDSEN, D., CHRISTOPHER-HENNINGS, J. & NELSON, E. (2014).** An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naive pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMC Vet Res* 10: 176.

42. DELMAS, B., GELFI, J., L'HARIDON, R., VOGEL, L. K., SJÖSTRÖM, H., NORÉN, O. & LAUDE, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357: 412-420.
43. DENG, F., YE, G., LIU, Q., NAVID, M. T., ZHONG, X., LI, Y., WAN, C., XIAO, S., HE, Q., FU, Z. F. & PENG, G. (2016). Identification and comparison of receptor binding characteristics of the spike protein of two porcine epidemic diarrhea virus strains. *Viruses* 8(3): 55.
44. DENG, X. & BAKER, S. C. (2018). An "Old" protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology* 517: 157-163.
45. DIEP, N. V., NORIMINE, J., SUEYOSHI, M., LAN, N. T. & YAMAGUCHI, R. (2017). Novel porcine epidemic diarrhea virus (pedv) variants with large deletions in the spike (S) gene coexist with pedv strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: A new disease situation. *PLoS One* 12(1): e0170126.
46. DING, L., HUANG, Y., DU, Q., DONG, F., ZHAO, X., ZHANG, W., XU, X. & TONG, D. (2014). TGEV nucleocapsid protein induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 445(2): 497-503.
47. DUFOUR, D., MATEOS-GOMEZ, P. A., ENJUANES, L., GALLEG0, J. & SOLA, I. (2011). Structure and functional relevance of a transcription-regulating sequence involved in coronavirus discontinuous RNA synthesis. *J Virol* 85(10): 4963-4973.
48. ECKERLE, L. D., BECKER, M. M., HALPIN, R. A., LI, K., VENTER, E., LU, X., SCHERBAKOVA, S., GRAHAM, R. L., BARIC, R. S., STOCKWELL, T. B., SPIRO, D. J. & DENISON, M. R. (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6(5): e1000896.
49. ECKERLE, L. D., LU, X., SPERRY, S. M., CHOI, L. & DENISON, M. R. (2007). High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J Virol* 81(22): 12135-12144.
50. EIFART, P., LUDWIG, K., BOTTCHEr, C., DE HAAN, C. A., ROTTIER, P. J., KORTE, T. & HERRMANN, A. (2007). Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. *J Virol* 81(19): 10758-10768.
51. ENJUANES, L., ALMAZAN, F., SOLA, I. & ZUNIGA, S. (2006). Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu Rev Microbiol* 60: 211-230.
52. ENJUANES, L., GORBALENYA, A. E., DE GROOT, R., COWLEY, J. A., ZIEBUHR, J. & SNIJDER, E. J. (2008). Nidovirales. *Encyclopedia of Virology*: 419-430.

53. FAN, B., YU, Z., PANG, F., XU, X., ZHANG, B., GUO, R., HE, K. & LI, B. (2017). Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone of a virulent porcine epidemic diarrhea virus strain AH2012/12 in China. *Virology* 500: 50-61.
54. FEHR, A. R. & PERLMAN, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282: 1-23.
55. FLANAGAN, E. B., ZAMPARO, J. M., BALL, L. A., RODRIGUEZ, L. L. & WERTZ, G. W. (2001). Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* 75(13): 6107-6114.
56. FLOREK, D., EHMANN, R., KRISTEN-BURMANN, C., LEMMERMEYER, T., LOCHNIT, G., ZIEBUHR, J., THIEL, H. J. & TEKES, G. (2017). Identification and characterization of a Golgi retention signal in feline coronavirus accessory protein 7b. *J Gen Virol* 98(8): 2017-2029.
57. GE, J. W., LIU, D. Q. & LI, Y. J. (2012). Construction of recombinant lactobacilli expressing the core neutralizing epitope (COE) of porcine epidemic diarrhea virus and a fusion protein consisting of COE and Escherichia coli heat-labile enterotoxin B, and comparison of the immune responses by orogastric immunization. *Can J Microbiol.*(58(11)): 1258-1267.
58. GOEDE, D. & MORRISON, R. B. (2016). Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Prev Vet Med* 123: 202-207.
59. GONG, L., LI, J., ZHOU, Q., XU, Z., CHEN, L., ZHANG, Y., XUE, C., WEN, Z. & CAO, Y. (2017). A new Bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017. *Emerg Infect Dis* 23(9).
60. GORBALENYA, A. E., ENJUANES, L., ZIEBUHR, J. & SNIJDER, E. J. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117(1): 17-37.
61. GRAHAM, R. L., BECKER, M. M., ECKERLE, L. D., BOLLES, M., DENISON, M. R. & BARIC, R. S. (2012). A live, impaired-fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease. *Nat Med* 18(12): 1820-1826.
62. GRASLAND, B., BIGAULT, L., BERNARD, C., QUENAULT, H., TOULOUSE, O., FABLET, C., ROSE, N., TOUZAIN, F. & BLANCHARD, Y. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene INDEL strain isolated in France in december 2014. *Genome Announc* 3(3).
63. GUSCETTI, F., BERNASCONI, C., TOBLER, K., VAN REETH, K., POSPISCHIL, A. & ACKERMANN, M. (1998). Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(3): 412-414.

64. HANKE, D., POHLMANN, A., SAUTER-LOUIS, C., HOPER, D., STADLER, J., RITZMANN, M., STEINRIGL, A., SCHWARZ, B. A., AKIMKIN, V., FUX, R., BLOME, S. & BEER, M. (2017). Porcine epidemic diarrhea in Europe: In-detail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology. *Viruses* 9(7).
65. HEALD-SARGENT, T. & GALLAGHER, T. (2012). Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 4(4): 557-580.
66. HENNIGER, T. & SCHWARZ, B. A. (2014). Porcine epidemic diarrhea (PED) - Neuausbrüche in deutschen Mastschweinebeständen. *Tierärztliche Umschau* 69: 394–398.
67. HERTZIG, T., SCANDELLA, E., SCHELLE, B., ZIEBUHR, J., SIDDELL, S. G., LUDEWIG, B. & THIEL, V. (2004). Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol* 85(Pt 6): 1717-1725.
68. HESS, R. G., BOLLWAHN, W., HEINRITZI, K., POSPISCHIL, A. & BACHMANN, P. A. (1980). Neue Aspekte der Virusätiologie bei Durchfallerkrankungen des Schweines: Vorkommen von Infektionen mit dem Epizootischen Virusdiarrhoe- (EVD-) Virus. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.*(93): 445-449.
69. HOFMANN, H., PYRC, K., VAN DER HOEK, L., GEIER, M., BERKHOUT, B. & POHLMANN, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(22): 7988-7993.
70. HOFMANN, M. & WYLER, R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 26(11): 2235-2239
71. HOMWONG, N., JARVIS, M. C., LAM, H. C., DIAZ, A., ROVIRA, A., NELSON, M. & MARTHALER, D. (2016). Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States. *Prev Vet Med* 123: 168-174.
72. HOU, Y., LIN, C. M., YOKOYAMA, M., YOUNT, B. L., MARTHALER, D., DOUGLAS, A. L., GHIMIRE, S., QIN, Y., BARIC, R. S., SAIF, L. J. & WANG, Q. (2017). Deletion of a 197-amino-acid region in the N-terminal domain of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in piglets. *J Virol* 91(14).
73. HSUE, B., HARTSHORNE, T. & MASTERS, P. S. (2000). Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J Virol* 74(15): 6911-6921.
74. HUAN, C. C., WANG, Y., NI, B., WANG, R., HUANG, L., REN, X. F., TONG, G. Z., DING, C., FAN, H. J. & MAO, X. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor. *Arch Virol* 160(7): 1621-1628.



- 75. HUANG, Y. W., DICKERMAN, A. W., PINEYRO, P., LI, L., FANG, L., KIEHNE, R., OPRIESSNIG, T. & MENG, X. J.** (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 4(5): e00737-00713.
- 76. INOUE, Y., TANAKA, N., TANAKA, Y., INOUE, S., MORITA, K., ZHUANG, M., HATTORI, T. & SUGAMURA, K.** (2007). Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J Virol* 81(16): 8722-8729.
- 77. JENGARN, J., WONGTHIDA, P., WANASEN, N., FRANTZ, P. N., WANITCHANG, A. & JONGKAEWWATTANA, A.** (2015). Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone. *J Gen Virol* 96(8): 2206-2218.
- 78. JI, C. M., WANG, B., ZHOU, J. & HUANG, Y. W.** (2018). Aminopeptidase-N-independent entry of porcine epidemic diarrhea virus into Vero or porcine small intestine epithelial cells. *Virology* 517: 16-23.
- 79. JINGHUI, F. & YIJING, L.** (2005). Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes* 30(1): 69-73.
- 80. JUNG, K., ANNAMALAI, T., LU, Z. & SAIF, L. J.** (2015). Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet Microbiol* 178(1-2): 31-40.
- 81. JUNG, K. & SAIF, L. J.** (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 204(2): 134-143.
- 82. JUNG, K. & SAIF, L. J.** (2017). Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res Vet Sci* 110: 12-15.
- 83. JUNG, K., WANG, Q., SCHEUER, K. A., LU, Z., ZHANG, Y. & SAIF, L.** (2014). Pathology of us porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerging Infectious Diseases* 20(4): 668-671.
- 84. KADOI, K., SUGIOKA, H., SATOH, T. & KADOI, B. K.** (2002). The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines. *New Microbiol* 25(3): 285-290.
- 85. KAMAU, A. N., PARK, J. E., PARK, E. S., YU, J. E., RHO, J. & SHIN, H. J.** (2017). Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 227: 150-157.
- 86. KAMITANI, W., NARAYANAN, K., HUANG, C., LOKUGAMAGE, K., IKEGAMI, T., ITO, N., KUBO, H. & MAKINO, S.** (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein

suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34): 12885-12890.

**87. KANG, H., FENG, M., SCHROEDER, M. E., GIEDROC, D. P. & LEIBOWITZ, J. L. (2006).** Putative cis-acting stem-loops in the 5' untranslated region of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can substitute for their mouse hepatitis virus counterparts. *J Virol* 80(21): 10600-10614.

**88. KANG, T. J., SEO, J. E., KIM, D. H., KIM, T. G., JANG, Y. S. & YANG, M. S. (2005).** Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif* 41(2): 378-383.

**89. KIM, S. H., LEE, J. M., JUNG, J., KIM, I. J., HYUN, B. H., KIM, H. I., PARK, C. K., OEM, J. K., KIM, Y. H., LEE, M. H. & LEE, K. K. (2015).** Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013. *Arch Virol* 160(4): 1055-1064.

**90. KIRCHDOERFER, R. N., COTTRELL, C. A., WANG, N., PALLESEN, J., YASSINE, H. M., TURNER, H. L., CORBETT, K. S., GRAHAM, B. S., McLELLAN, J. S. & WARD, A. B. (2016).** Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531(7592): 118-121.

**91. KLAUSEGGER, A., STROBL, B., REGL, G., KASER, A., LUYTJES, W. & VLASAK, R. (1999).** Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. *J Virol* 73(5): 3737–3743.

**92. KNOOPS, K., KIKKERT, M., WORM, S. H., ZEVENHOVEN-DOBBE, J. C., VAN DER MEER, Y., KOSTER, A. J., MOMMAAS, A. M. & SNIJDER, E. J. (2008).** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 6(9): e226.

**93. KREMPL, C. & HERRLER, G. (2001).** Sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus affects sedimentation behavior of virions and solubilized glycoproteins. *J Virol* 75(2): 844-849.

**94. KREMPL, C., SCHULTZE, B., LAUDE, H. & HERRLER, G. (1997).** Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 71(4): 3285-3287.

**95. KRISTEN-BURMANN, C., ROGGER, P., EHMANN, R., RAPPE, J., STALDER, H., POSTHAUS, H., VEIGA, I., RUGGLI, N., ACKERMANN, M., THIEL, V. & TEKES, G. (2018).** Effect of S and ORF3 protein on the virulence of porcine epidemic diarrhea virus. *Manuskript in Vorbereitung*.

- 96. KUO, L., KOETZNER, C. A., HURST, K. R. & MASTERS, P. S. (2014).** Recognition of the murine coronavirus genomic RNA packaging signal depends on the second RNA-binding domain of the nucleocapsid protein. *J Virol* 88(8): 4451-4465.
- 97. KUO, L., KOETZNER, C. A. & MASTERS, P. S. (2016).** A key role for the carboxy-terminal tail of the murine coronavirus nucleocapsid protein in coordination of genome packaging. *Virology* 494: 100-107.
- 98. KUSANAGI, K., KUWAHARA, H., KATOH, T., NUNOYA, T., ISHIKAWA, Y., SAMEJIMA, T. & TAJIMA, M. (1992).** Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci* 54(2): 313-318.
- 99. KWEON, C. H., KWON, B. J., LEE, J. G., KWON, G. O. & KANG, Y. B. (1999).** Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* 17(20-21): 2546-2553.
- 100. LAEMMLI, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- 101. LAI, M. M., BARIC, R., BRAYTON, P. R. & STOHLMAN, S. A. (1984).** Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3626-3630.
- 102. LAI, M. M., PATTON, C. D., BARIC, R. & STOHLMAN, S. A. (1983).** Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus. *J Virol* 46(3): 1027-1033
- 103. LAI, M. M., PATTON, C. D. & STOHLMAN, S. A. (1982).** Replication of mouse hepatitis virus: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length. *J Virol* 44(2): 487-492.
- 104. LAI, M. M. & STOHLMAN, S. A. (1978).** RNA of mouse hepatitis virus. *J Virol* 26(2): 236-242
- 105. LAI, M. M. & STOHLMAN, S. A. (1981).** Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J Virol* 38(2): 661-670.
- 106. LANGEL, S. N., PAIM, F. C., LAGER, K. M., VLASOVA, A. N. & SAIF, L. J. (2016).** Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Res* 226: 93-107.
- 107. LAWRENCE, P. K., BUMGARDNER, E., BEY, R. F., STINE, D. & BUMGARNER, R. E. (2014).** Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: in vivo and in vitro phenotypes. *Genome Announc* 2(3).

- 108. LEE, C.** (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology* 12: 193.
- 109. LEE, D. K., PARK, C. K., KIM, S. H. & LEE, C.** (2010). Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res* 149(2): 175-182.
- 110. LEE, S. & LEE, C.** (2014). Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 20(7): 1223-1226.
- 111. LEE, S., SON, K. Y., NOH, Y. H., LEE, S. C., CHOI, H. W., YOON, I. J. & LEE, C.** (2017). Genetic characteristics, pathogenicity, and immunogenicity associated with cell adaptation of a virulent genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus. *Vet Microbiol* 207: 248-258.
- 112. LEIBOWITZ, J. L. & WEISS, S. R.** (1981). Murine coronavirus RNA. *Adv Exp Med Biol* 142: 227-243.
- 113. LEIDENBERGER, S., SCHRODER, C., ZANI, L., AUSTE, A., PINETTE, M., AMBAGALA, A., NIKOLIN, V., DE SMIT, H., BEER, M. & BLOME, S.** (2017). Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies. *Sci Rep* 7(1): 10825.
- 114. LI, B. X., GE, J. W. & LI, Y. J.** (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365(1): 166-172.
- 115. LI, C., LI, W., LUCIO DE ESESARTE, E., GUO, H., VAN DEN ELZEN, P., AARTS, E., VAN DEN BORN, E., ROTTIER, P. J. M. & BOSCH, B. J.** (2017). Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *J Virol* 91(12).
- 116. LI, C., LI, Z., ZOU, Y., WICHT, O., VAN KUPPEVELD, F. J., ROTTIER, P. J. & BOSCH, B. J.** (2013). Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination. *PLoS One* 8(8): e69997.
- 117. LI, J., JIN, Z., GAO, Y., ZHOU, L., GE, X., GUO, X., HAN, J. & YANG, H.** (2017). Development of the full-length cDNA clones of two porcine epidemic diarrhea disease virus isolates with different virulence. *PLoS One* 12(3): e0173998.
- 118. LI, L., KANG, H., LIU, P., MAKKINJE, N., WILLIAMSON, S. T., LEIBOWITZ, J. L. & GIEDROC, D. P.** (2008). Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. *J Mol Biol* 377(3): 790-803.
- 119. LI, R., QIAO, S., YANG, Y., SU, Y., ZHAO, P., ZHOU, E. & ZHANG, G.** (2014). Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in central China based on the ORF3 gene and the main neutralization epitopes. *Arch Virol* 159(5): 1057-1065.

120. LI, W., LI, H., LIU, Y., PAN, Y., DENG, F., SONG, Y., TANG, X. & HE, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 18(8): 1350-1353.
121. LI, W., LUO, R., HE, Q., VAN KUPPEVELD, F. J. M., ROTTIER, P. J. M. & BOSCH, B. J. (2017). Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Res* 235: 6-13.
122. LI, W., MOORE, M. J., VASILIEVA, N., SUI, J., WONG, S. K., BERNE, M. A., SOMASUNDARAN, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K., GREENOUGH, T. C., CHOE, H. & FARZAN, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-454.
123. LI, W., VAN KUPPEVELD, F. J. M., HE, Q., ROTTIER, P. J. M. & BOSCH, B. J. (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 226: 117-127.
124. LI, W., WICHT, O., VAN KUPPEVELD, F. J., HE, Q., ROTTIER, P. J. & BOSCH, B. J. (2015). A single point mutation creating a furin cleavage site in the spike protein renders porcine epidemic diarrhea coronavirus trypsin independent for cell entry and fusion. *J Virol* 89(15): 8077-8081.
125. LIN, C. M., ANNAMALAI, T., LIU, X., GAO, X., LU, Z., EL-THOLOTH, M., HU, H., SAIF, L. J. & WANG, Q. (2015). Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet Res* 46: 134.
126. LIN, C. M., HOU, Y., MARTHALER, D. G., GAO, X., LIU, X., ZHENG, L., SAIF, L. J. & WANG, Q. (2017). Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage. *Vet Microbiol* 201: 62-71.
127. LIN, C. M., SAIF, L. J., MARTHALER, D. & WANG, Q. (2016). Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res* 226: 20-39.
128. LIU, C., MA, Y., YANG, Y., ZHENG, Y., SHANG, J., ZHOU, Y., JIANG, S., DU, L., LI, J. & LI, F. (2016). Cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus is activated by lysosomal proteases. *J Biol Chem* 291(47): 24779-24786.
129. LIU, C., TANG, J., MA, Y., LIANG, X., YANG, Y., PENG, G., QI, Q., JIANG, S., LI, J., DU, L. & LI, F. (2015). Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J Virol* 89(11): 6121-6125.
130. LIU, P., LI, L., KEANE, S. C., YANG, D., LEIBOWITZ, J. L. & GIEDROC, D. P. (2009). Mouse hepatitis virus stem-loop 2 adopts a uYNMG(U)a-like tetraloop structure that is highly functionally tolerant of base substitutions. *J Virol* 83(23): 12084-12093.

131. LIU, P., LI, L., MILLERSHIP, J. J., KANG, H., LEIBOWITZ, J. L. & GIEDROC, D. P. (2007). A U-turn motif-containing stem-loop in the coronavirus 5' untranslated region plays a functional role in replication. *RNA* 13(5): 763-780.
132. LIU, X., LIN, C. M., ANNAMALAI, T., GAO, X., LU, Z., ESSEILI, M. A., JUNG, K., EL-THOLOTH, M., SAIF, L. J. & WANG, Q. (2015). Determination of the infectious titer and virulence of an original US porcine epidemic diarrhea virus PC22A strain. *Vet Res* 46: 109.
133. LOMNICZI, B. (1977). Biological properties of avian coronavirus RNA. *J Gen Virol* 36: 531-533.
134. LOWE, J., GAUGER, P., HARMON, K., ZHANG, J., CONNOR, J., YESKE, P., LOULA, T., LEVIS, I., DUFRESNE, L. & MAIN, R. (2014). Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis* 20(5): 872-874.
135. LU, W., ZHENG, B. J., XU, K., SCHWARZ, W., DU, L., WONG, C. K., CHEN, J., DUAN, S., DEUBEL, V. & SUN, B. (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12540-12545.
136. MADHUGIRI, R., FRICKE, M., MARZ, M. & ZIEBUHR, J. (2014). RNA structure analysis of alphacoronavirus terminal genome regions. *Virus Res* 194: 76-89.
137. MADHUGIRI, R., FRICKE, M., MARZ, M. & ZIEBUHR, J. (2016). Coronavirus cis-acting RNA elements. *Adv Virus Res.* Ziebuhr, J. 96: 127-163.
138. MADHUGIRI, R., KARL, N., PETERSEN, D., LAMKIEWICZ, K., FRICKE, M., WEND, U., SCHEUER, R., MARZ, M. & ZIEBUHR, J. (2018). Structural and functional conservation of cis-acting RNA elements in coronavirus 5'-terminal genome regions. *Virology* 517: 44-55.
139. MARTELLI, R., LAVAZZA, A., NIGRELLI, A. D., MERIALM, G., ALBORALI, L. G. & PENZAERT, M. B. (2008). Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record* 162(10): 307-310.
140. MASTERS, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 66: 193-292.
141. MASUDA, T., MURAKAMI, S., TAKAHASHI, O., MIYAZAKI, A., OHASHI, S., YAMASATO, H. & SUZUKI, T. (2015). New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs. *Arch Virol* 160(10): 2565-2568.
142. MESQUITA, J. R., HAKZE-VAN DER HONING, R., ALMEIDA, A., LOURENCO, M., VAN DER POEL, W. H. & NASCIMENTO, M. S. (2015). Outbreak of porcine epidemic diarrhea virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis* 62(6): 586-588.

143. MIELECH, A. M., CHEN, Y., MESECAR, A. D. & BAKER, S. C. (2014). Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Res* 194: 184-190.
144. MILLET, J. K. & WHITTAKER, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 202: 120-134.
145. MOLENKAMP, R. & SPAAN, W. (1997). Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal. *Virology* 239: 78–86.
146. MORENO, J. L., ZUNIGA, S., ENJUANES, L. & SOLA, I. (2008). Identification of a coronavirus transcription enhancer. *J Virol* 82(8): 3882-3893.
147. MURAKAMI, S., MIYAZAKI, A., TAKAHASHI, O., HASHIZUME, W., HASE, Y., OHASHI, S. & SUZUKI, T. (2015). Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus variant Tottori2/JPN/2014. *Genome Announc* 3(4).
148. NAGY, B., NAGY, G., MEDER, M. & MOCSARI, E. (1996). Enterotoxigenic Escherichia coli, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Vet Hung* 44(1): 9-19.
149. NARAYANAN, K., CHEN, C. J., MAEDA, J. & MAKINO, S. (2003). Nucleocapsid-Independent Specific Viral RNA Packaging via Viral Envelope Protein and Viral RNA Signal. *Journal of Virology* 77(5): 2922-2927.
150. NEDELLEC, P., DVEKSLER, G. S., DANIELS, E., TURBIDE, C., CHOW, B., BASILE, A. A., HOLMES, K. V. & BEAUCHEMIN, N. (1994). Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 68(7): 4525-4537
151. NEUMAN, B. W., ADAIR, B. D., YOSHIOKA, C., QUISPE, J. D., ORCA, G., KUHN, P., MILLIGAN, R. A., YEAGER, M. & BUCHMEIER, M. J. (2006). Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *J Virol* 80(16): 7918-7928.
152. NEUMAN, B. W. & BUCHMEIER, M. J. (2016). Supramolecular architecture of the coronavirus particle. *Adv Virus Res.* 96: 1-27.
153. NIEDERWERDER, M. C., NIETFELD, J. C., BAI, J., PEDDIREDDI, L., BREAZEALE, B., ANDERSON, J., KERRIGAN, M. A., AN, B., OBERST, R. D., CRAWFORD, K., LAGER, K. M., MADSON, D. M., ROWLAND, R. R., ANDERSON, G. A. & HESSE, R. A. (2016). Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of

Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs. *J Vet Diagn Invest* 28(6): 671-678.

**154. NOMURA, R., KIYOTA, A., SUZAKI, E., KATAOKA, K., OHE, Y., MIYAMOTO, K., SENDA, T. & FUJIMOTO, T. (2004).** Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol* 78(16): 8701-8708.

**155. OKA, T., SAIF, L. J., MARTHALER, D., ESSEILI, M. A., MEULIA, T., LIN, C. M., VLASOVA, A. N., JUNG, K., ZHANG, Y. & WANG, Q. (2014).** Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol* 173(3-4): 258-269.

**156. OKDA, F. A., LAWSON, S., SINGREY, A., NELSON, J., HAIN, K. S., JOSHI, L. R., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., NELSON, E. A. & DIEL, D. G. (2017).** The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes. *Virology* 509: 185-194.

**157. OLANRATMANEE, E. O., KUNAVONGKRIT, A. & TUMMARUK, P. (2010).** Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci* 122(1-2): 42-51.

**158. OLDHAM, J. (1972).** Letter to the editor. *Pig Farming* 10: 72-73.

**159. OPRIESSNIG, T., GERBER, P. F., SHEN, H., DE CASTRO, A., ZHANG, J., CHEN, Q. & HALBUR, P. (2017).** Evaluation of the efficacy of a commercial inactivated genogroup 2b-based porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine and experimental live genogroup 1b exposure against 2b challenge. *Vet Res* 48(1): 69.

**160. ORTEGO, J., CERIANI, J. E., PATINO, C., PLANA, J. & ENJUANES, L. (2007).** Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 368(2): 296-308.

**161. OSZVALD, M., KANG, T. J., TOMOSKOZI, S., TAMAS, C., TAMAS, L., KIM, T. G. & YANG, M. S. (2007).** Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin in rice endosperm. *Mol Biotechnol* 35(3): 215-223.

**162. OUDSHOORN, D., RIJS, K., LIMPENS, R., GROEN, K., KOSTER, A. J., SNIJDER, E. J., KIKKERT, M. & BARCENA, M. (2017).** Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral rna replication. *MBio* 8(6).



- 163. PAN, Y., TIAN, X., QIN, P., WANG, B., ZHAO, P., YANG, Y. L., WANG, L., WANG, D., SONG, Y., ZHANG, X. & HUANG, Y. W. (2017).** Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet Microbiol* 211: 15-21.
- 164. PARK, J. E., CRUZ, D. J. & SHIN, H. J. (2011).** Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion. *Arch Virol* 156(10): 1749-1756.
- 165. PARK, J. E., PARK, E. S., YU, J. E., RHO, J., PAUDEL, S., HYUN, B. H., YANG, D. K. & SHIN, H. J. (2015).** Development of transgenic mouse model expressing porcine aminopeptidase N and its susceptibility to porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 197: 108-115.
- 166. PARK, J. E. & SHIN, H. J. (2014).** Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Res* 191: 143-152.
- 167. PARK, S., KIM, S., SONG, D. & PARK, B. (2014).** Novel porcine epidemic diarrhea virus variant with large genomic deletion, South Korea. *Emerg Infect Dis* 20(12): 2089-2092.
- 168. PARK, S. J., KIM, H. K., SONG, D. S., AN, D. J. & PARK, B. K. (2012).** Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol* 86(10): 5964.
- 169. PARK, S. J., MOON, H. J., LUO, Y., KIM, H. K., KIM, E. M., YANG, J. S., SONG, D. S., KANG, B. K., LEE, C. S. & PARK, B. K. (2008).** Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes* 36(1): 95-104.
- 170. PARK, S. J., SONG, D. S. & PARK, B. K. (2013).** Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol* 158(7): 1533-1541.
- 171. PASTERNAK, A. O., VAN DEN BORN, E., SPAAN, W. J. & SNIJDER, E. J. (2001).** Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J* 20(24): 7220-7228.
- 172. PENSAERT, M. (1999).** Porcine epidemic diarrhea. *Diseases of swine*: 179-185.
- 173. PENSAERT, M., CALLEBAUT, P. & DE BOUCK, P. (1982).** Present knowledge. *Int Congr Pig Vet Soc* 52.
- 174. PENSAERT, M. & DE BOUCK, P. (1978).** A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine *Arch Virol* 58: 243-247.
- 175. PENSAERT, M. B. & MARTELLI, P. (2016).** Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Res* 226: 1-6.

- 176. PIJPERS, A., VAN NIEUWSTADT, A. P., TERPSTRA, C. & VERHEIJDEN, J. H.** (1993). Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec* 132(6): 129-131.
- 177. PURANAVEJA, S., POOLPERM, P., LERTWATCHARASARAKUL, P., KESDAENGSAPONWUT, S., BOONSOONGNERN, A., URAIRONG, K., KITIKOON, P., CHOOJAI, P., KEDKOVID, R., TEANKUM, K. & THANAWONGNUWECH, R.** (2009). Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 15(7): 1112-1115.
- 178. RAJ, V. S., MOU, H., SMITS, S. L., DEKKERS, D. H., MULLER, M. A., DIJKMAN, R., MUTH, D., DEMMERS, J. A., ZAKI, A., FOUCHIER, R. A., THIEL, V., DROSTEN, C., ROTTIER, P. J., OSTERHAUS, A. D., BOSCH, B. J. & HAAGMANS, B. L.** (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495(7440): 251-254.
- 179. REGUERA, J., ORDONO, D., SANTIAGO, C., ENJUANES, L. & CASASNOVAS, J. M.** (2011). Antigenic modules in the N-terminal S1 region of the transmissible gastroenteritis virus spike protein. *J Gen Virol* 92(Pt 5): 1117-1126.
- 180. REGUERA, J., SANTIAGO, C., MUDGAL, G., ORDONO, D., ENJUANES, L. & CASASNOVAS, J. M.** (2012). Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog* 8(8): e1002859.
- 181. SAIF, L. & WESLEY, R. D.** (1999). Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. *Diseases of swine*: 295-325.
- 182. SAIKATENDU, K. S., JOSEPH, J. S., SUBRAMANIAN, V., NEUMAN, B. W., BUCHMEIER, M. J., STEVENS, R. C. & KUHN, P.** (2007). Ribonucleocapsid formation of severe acute respiratory syndrome coronavirus through molecular action of the N-terminal domain of N protein. *J Virol* 81(8): 3913-3921.
- 183. SATO, T., TAKEYAMA, N., KATSUMATA, A., TUCHIYA, K., KODAMA, T. & KUSANAGI, K.** (2011). Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus Genes* 43(1): 72-78.
- 184. SAWICKI, D. L., WANG, T. & SAWICKI, S. G.** (2001). The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus. *J Gen Virol* 82: 385–396.
- 185. SAWICKI, S. G. & SAWICKI, D. L.** (1995). Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* 380: 499-506.
- 186. SAWICKI, S. G. & SAWICKI, D. L.** (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* 440: 215-219.

- 187. SAWICKI, S. G., SAWICKI, D. L. & SIDDELL, S. G.** (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* 81(1): 20-29.
- 188. SCHOCHETMAN, G., STEVENS, R. H. & SIMPSON, R. W.** (1977). Presence of infectious polyadenylated RNA in coronavirus avian bronchitis virus. *Virology* 77(2): 772-782.
- 189. SCHULTZE, B. & HERRLER, G.** (1992). Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J Gen Virol* 73: 901-906.
- 190. SCHULTZE, B., KREMPL, C., BALLESTEROS, M. L., SHAW, L., SCHAUER, R., ENJUANES, L. & HERRLER, G.** (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J Virol* 70(8): 5634–5637.
- 191. SCHWEGMANN-WESSELS, C. & HERRLER, G.** (2006). Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj J* 23(1-2): 51-58.
- 192. SHAHWAN, K., HESSE, M., MORK, A. K., HERRLER, G. & WINTER, C.** (2013). Sialic acid binding properties of soluble coronavirus spike (S1) proteins: differences between infectious bronchitis virus and transmissible gastroenteritis virus. *Viruses* 5(8): 1924-1933.
- 193. SHIBATA, I., TSUDA, T., MORI, M., ONO, M., SUEYOSHI, M. & URUNO, K.** (2000). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet Microbiol* 72: 173-182.
- 194. SHIRATO, K., MAEJIMA, M., ISLAM, M. T., MIYAZAKI, A., KAWASE, M., MATSUYAMA, S. & TAGUCHI, F.** (2016). Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity. *J Gen Virol* 97(10): 2528-2539.
- 195. SHIRATO, K., MATSUYAMA, S., UJIKE, M. & TAGUCHI, F.** (2011). Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol* 85(15): 7872-7880.
- 196. SMID, B., VALICEK, L., RODAK, L., KUDRNA, J. & MUSILOVA, J.** (1993). [Detection of porcine epidemic diarrhea virus using electron microscopy in the Czech Republic]. *Vet Med (Praha)* 38(6): 333-341.
- 197. SNIJDER, E. J., BREDENBEEK, P. J., DOBBE, J. C., THIEL, V., ZIEBUHR, J., POON, L. L., GUAN, Y., ROZANOV, M., SPAAN, W. J. & GORBALENYA, A. E.** (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* 331(5): 991-1004.

- 198. SNIJDER, E. J., DECROLY, E. & ZIEBUHR, J. (2016).** The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv Virus Res.* Ziebuhr, J. 96: 59-126.
- 199. SOLA, I., ALMAZAN, F., ZUNIGA, S. & ENJUANES, L. (2015).** Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu Rev Virol* 2(1): 265-288.
- 200. SOLA, I., MATEOS-GOMEZ, P. A., ALMAZAN, F., ZUNIGA, S. & ENJUANES, L. (2011).** RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol* 8(2): 237-248.
- 201. SOLA, I., MORENO, J. L., ZUNIGA, S., ALONSO, S. & ENJUANES, L. (2005).** Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* 79(4): 2506-2516.
- 202. SONG, D., MOON, H. & KANG, B. (2015).** Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 4(2): 166-176.
- 203. SONG, D. & PARK, B. (2012).** Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44(2): 167-175.
- 204. SONG, D. S., OH, J. S., KANG, B. K., YANG, J. S., MOON, H. J., YOO, H. S., JANG, Y. S. & PARK, B. K. (2007).** Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res Vet Sci* 82(1): 134-140.
- 205. SPAAN, W., DELIUS, H., SKINNER, M., ARMSTRONG, J., ROTTIER, P., SMEEKENS, S., VAN DER ZEIJST, B. A. & SIDDELL, S. G. (1983).** Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J* 2(10): 1839-1844.
- 206. SPAAN, W., ROTTIER, P., HORZINEK, M. & VAN DER ZEIJST, B. A. (1982).** Sequence relationships between the genome and the intracellular RNA species 1, 3, 6, and 7 of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 42(2): 432-439
- 207. STADLER, J., ZOELS, S., FUX, R., HANKE, D., POHLMANN, A., BLOME, S., WEISSENBOCK, H., WEISSENBACHER-LANG, C., RITZMANN, M. & LADINIG, A. (2015).** Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res* 11: 142.
- 208. STEVENSON, G. W., HOANG, H., SCHWARTZ, K. J., BURROUGH, E. R., SUN, D., MADSON, D., COOPER, V. L., PILLATZKI, A., GAUGER, P., SCHMITT, B. J., KOSTER, L. G., KILLIAN, M. L. & YOON, K. J. (2013).** Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 25(5): 649-654.
- 209. SU, Y. P., FAN, Y. H. & BRIAN, D. A. (2014).** Dependence of coronavirus RNA replication on an NH2-terminal partial nonstructural protein 1 in cis. *J Virol* 88(16): 8868-8882.

- 210. SUEYOSHI, M., TSUDA, T., YAMAZAKI, K., YOSHIDA, K., NAKAZAWA, M., SATO, K., MINAMI, T., IWASHITA, K., WATANABE, M., SUZUKI, Y. & ET AL. (1995).** An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J Comp Pathol* 113(1): 59-67.
- 211. SUN, D., FENG, L., SHI, H., CHEN, J., CUI, X., CHEN, H., LIU, S., TONG, Y., WANG, Y. & TONG, G. (2008).** Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet Microbiol* 131(1-2): 73-81.
- 212. SUN, D. B., FENG, L., SHI, H. Y., CHEN, J. F., LIU, S. W., CHEN, H. Y. & WANG, Y. F. (2007).** Spike protein region (aa 636789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol* 51(3): 149-156.
- 213. SUN, M., MA, J., WANG, Y., WANG, M., SONG, W., ZHANG, W., LU, C. & YAO, H. (2015).** Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia. *J Clin Microbiol* 53(5): 1484-1492.
- 214. SUN, M., MA, J., YU, Z., PAN, Z., LU, C. & YAO, H. (2017).** Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways. *Vet Res* 48(1): 44.
- 215. SUN, R., LENG, Z., ZHAI, S. L., CHEN, D. & SONG, C. (2014).** Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes. *ScientificWorldJournal* 2014: 208439.
- 216. SUN, R. Q., CAI, R. J., CHEN, Y. Q., LIANG, P. S., CHEN, D. K. & SONG, C. X. (2012).** Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis* 18(1): 161-163.
- 217. SUZUKI, T., MURAKAMI, S., TAKAHASHI, O., KODERA, A., MASUDA, T., ITOH, S., MIYAZAKI, A., OHASHI, S. & TSUTSUI, T. (2015).** Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect Genet Evol* 36: 363-368.
- 218. SUZUKI, T., SHIBAHARA, T., YAMAGUCHI, R., NAKADE, K., YAMAMOTO, T., MIYAZAKI, A. & OHASHI, S. (2016).** Pig epidemic diarrhoea virus S gene variant with a large deletion non-lethal to colostrum-deprived newborn piglets. *J Gen Virol* 97(8): 1823-1828.
- 219. TEERAVECHYAN, S., FRANTZ, P. N., WONGTHIDA, P., CHAILANGKARN, T., JARU-AMPORN PAN, P., KOONPAEW, S. & JONGKAEWWATTANA, A. (2016).** Deciphering the biology of porcine epidemic diarrhea virus in the era of reverse genetics. *Virus Res* 226: 152-171.
- 220. TEKES, G. (2016).** Vaccinia virus-based reverse genetics for feline coronaviruses. *Animal Coronaviruses, Springer Protocol Handbooks*. Wang, L.: 73-90.

- 221. TEKES, G., HOFMANN-LEHMANN, R., BANK-WOLF, B., MAIER, R., THIEL, H. J. & THIEL, V.** (2010). Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *J Virol* 84(3): 1326-1333.
- 222. TEKES, G., HOFMANN-LEHMANN, R., STALLKAMP, I., THIEL, V. & THIEL, H. J.** (2008). Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *J Virol* 82(4): 1851-1859.
- 223. TEKES, G., SPIES, D., BANK-WOLF, B., THIEL, V. & THIEL, H. J.** (2012). A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. *J Virol* 86(12): 6994-6998.
- 224. THIEL, V., HEROLD, J., SCHELLE, B. & SIDDELL, S. G.** (2001). Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* 82: 1273–1281.
- 225. TIAN, P. F., JIN, Y. L., XING, G., QV, L. L., HUANG, Y. W. & ZHOU, J. Y.** (2014). Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013. *Emerg Infect Dis* 20(10): 1735-1738.
- 226. TIAN, Y., YU, Z., CHENG, K., LIU, Y., HUANG, J., XIN, Y., LI, Y., FAN, S., WANG, T., HUANG, G., FENG, N., YANG, Z., YANG, S., GAO, Y. & XIA, X.** (2013). Molecular characterization and phylogenetic analysis of new variants of the porcine epidemic diarrhea virus in Gansu, China in 2012. *Viruses* 5(8): 1991-2004.
- 227. TRESNAN, D. B., LEVIS, R. & HOLMES, K. V.** (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol* 70(12): 8669-8674.
- 228. TURGEON, D. C., MORIN, M., JOLETTE, J., HIGGINS, R., MARSOLAIS, G. & DI FRANCO, E.** (1981). Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in Quebec. *Can Vet J* 21: 100-101.
- 229. UTIGER, A., ROSSKOPF, M., GUSCETTI, F. & ACKERMANN, M.** (1993). Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27 kD glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhoea virus infected cells. *Adv Exp Med Biol* 342: 197-202.
- 230. VAN MARLE, G., DOBBE, J. C., GULTYAEV, A. P., LUYTJES, W., SPAAN, W. & SNIJDER, E. J.** (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12056-12061.

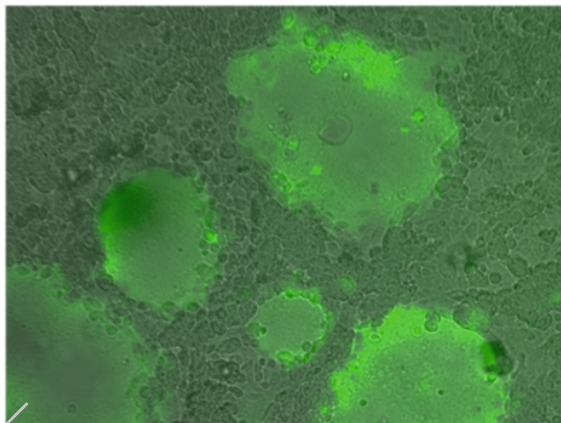
- 231. VAN REETH, K. & PENZAERT, M. (1994).** Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet Rec* 135(25): 594-597.
- 232. VLASOVA, A. N., MARTHALER, D., WANG, Q., CULHANE, M. R., ROSSOW, K. D., ROVIRA, A., COLLINS, J. & SAIF, L. J. (2014).** Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg Infect Dis* 20(10): 1620-1628.
- 233. VUI, D. T., TUNG, N., INUI, K., SLATER, S. & NILUBOL, D. (2014).** Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnam. *Genome Announc* 2(4).
- 234. WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., BOSCH, B. J., FRENZ, B., ROTTIER, P. J. M., DIMAIO, F., REY, F. A. & VEESLER, D. (2016a).** Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 531(7592): 114-117.
- 235. WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., FRENZ, B., SNIJDER, J., LI, W., REY, F. A., DIMAIO, F., BOSCH, B. J. & VEESLER, D. (2016b).** Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* 23(10): 899-905.
- 236. WANG, D., FANG, L. & XIAO, S. (2016).** Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Res* 226: 7-13.
- 237. WANG, D., GE, X., CHEN, D., LI, J., CAI, Y., DENG, J., ZHOU, L., GUO, X., HAN, J. & YANG, H. (2018).** The S gene is necessary but not sufficient for the virulence of porcine epidemic diarrhea virus novel variant strain BJ2011C. *J Virol* 92(13).
- 238. WANG, J., ZHAO, P., GUO, L., LIU, Y., DU, Y., REN, S., LI, J., ZHANG, Y., FAN, Y., HUANG, B., LIU, S. & WU, J. (2013).** Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect Dis* 19(12): 2048-2049.
- 239. WANG, K., LU, W., CHEN, J., XIE, S., SHI, H., HSU, H., YU, W., XU, K., BIAN, C., FISCHER, W. B., SCHWARZ, W., FENG, L. & SUN, B. (2012).** PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett* 586(4): 384-391.
- 240. WANG, L., BYRUM, B. & ZHANG, Y. (2014).** New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 20(5): 917-919.
- 241. WANG, L., HAYES, J., BYRUM, B. & ZHANG, Y. (2016).** US variant porcine epidemic diarrhea virus: histological lesions and genetic characterization. *Virus Genes* 52(4): 578-581.
- 242. WANG, X., CHEN, J., SHI, D., SHI, H., ZHANG, X., YUAN, J., JIANG, S. & FENG, L. (2016).** Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2. *Arch Virol* 161(3): 537-547.

- 243. WEGE, H., MÜLLER, A. & TER MEULEN, V. (1978).** Genomic RNA of the murine coronavirus JHM. *J Gen Virol* 41: 217-227.
- 244. WERTZ, G. W., PEREPELTSIA, V. P. & BALL, L. A. (1998).** Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3501-3506.
- 245. WICHT, O., LI, W., WILLEMS, L., MEULEMAN, T. J., WUBBOLTS, R. W., VAN KUPPEVELD, F. J., ROTTIER, P. J. & BOSCH, B. J. (2014).** Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *J Virol* 88(14): 7952-7961.
- 246. WILLIAMS, R. K., JIANG, G.-S. & HOLMES, K. V. (1991).** Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5533-5536,.
- 247. WITTE, K. H., PRAGER, D., ERNST, H. & NIENHOFF, H. (1981).** Die epizootische Virusdiarrhoe (EVD). *Tierärztliche Umschau*(36): 235-250.
- 248. WONGTHIDA, P., LIWNAREE, B., WANASEN, N., NARKPUK, J. & JONGKAEWWATTANA, A. (2017).** The role of ORF3 accessory protein in replication of cell-adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Arch Virol* 162(9): 2553-2563.
- 249. WOO, P. C., LAU, S. K., LAM, C. S., LAU, C. C., TSANG, A. K., LAU, J. H., BAI, R., TENG, J. L., TSANG, C. C., WANG, M., ZHENG, B. J., CHAN, K. H. & YUEN, K. Y. (2012).** Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol* 86(7): 3995-4008.
- 250. WU, H. Y., OZDARENDELI, A. & BRIAN, D. A. (2006).** Bovine coronavirus 5'-proximal genomic acceptor hotspot for discontinuous transcription is 65 nucleotides wide. *J Virol* 80(5): 2183-2193.
- 251. XU, X., ZHANG, H., ZHANG, Q., DONG, J., LIANG, Y., HUANG, Y., LIU, H. J. & TONG, D. (2013).** Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virol J* 10: 26.
- 252. YAMAMOTO, T., SUZUKI, T., OHASHI, S., MIYAZAKI, A. & TSUTSUI, T. (2016).** Genomic motifs as a novel indicator of the relationship between strains isolated from the epidemic of porcine epidemic diarrhea in 2013-2014. *PLoS One* 11(1): e0147994.
- 253. YANG, D. & LEIBOWITZ, J. L. (2015).** The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res* 206: 120-133.



- 254. YANG, D., LIU, P., GIEDROC, D. P. & LEIBOWITZ, J.** (2011). Mouse hepatitis virus stem-loop 4 functions as a spacer element required to drive subgenomic RNA synthesis. *J Virol* 85(17): 9199-9209.
- 255. YEAGER, C. L., ASHMUN, R. A., WILLIAMS, R. K., CARDELLICCHIO, C. B., SHAPIRO, L. H., LOOK, A. T. & HOLMES, K. V.** (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420-422.
- 256. YOUNT, B., CURTIS, K. M. & BARIC, R.** (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: Transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* 74(22): 10600–10611.
- 257. YOUNT, B., CURTIS, K. M., FRITZ, E. A., HENSLEY, L. E., JAHRLING, P. B., PRENTICE, E., DENISON, M. R., GEISBERT, T. W. & BARIC, R. S.** (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12995-13000.
- 258. YOUNT, B., DENISON, M. R., WEISS, S. R. & BARIC, R. S.** (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 76(21): 11065-11078.
- 259. ZENG, R., YANG, R. F., SHI, M. D., JIANG, M. R., XIE, Y. H., RUAN, H. Q., JIANG, X. S., SHI, L., ZHOU, H., ZHANG, L., WU, X. D., LIN, Y., JI, Y. Y., XIONG, L., JIN, Y., DAI, E. H., WANG, X. Y., SI, B. Y., WANG, J., WANG, H. X., WANG, C. E., GAN, Y. H., LI, Y. C., CAO, J. T., ZUO, J. P., SHAN, S. F., XIE, E., CHEN, S. H., JIANG, Z. Q., ZHANG, X., WANG, Y., PEI, G., SUN, B. & WU, J. R.** (2004). Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. *J Mol Biol* 341(1): 271-279.
- 260. ZHANG, J., YIM-IM, W., CHEN, Q., ZHENG, Y., SCHUMACHER, L., HUANG, H., GAUGER, P., HARMON, K. & LI, G.** (2018). Identification of porcine epidemic diarrhea virus variant with a large spike gene deletion from a clinical swine sample in the United States. *Virus Genes* 54(2): 323-327.
- 261. ZHANG, Q., SHI, K. & YOO, D.** (2016). Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology* 489: 252-268.
- 262. ZHANG, Q. & YOO, D.** (2016). Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Res* 226: 128-141.
- 263. ZIEBUHR, J., HEROLD, J. & SIDDELL, S. G.** (1995). Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J Virol* 69(7): 4331-4338.

- 264. ZIEBUHR, J. & SIDDELL, S. G.** (1999). Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab. *J Virol* 73(1): 177-185.
- 265. ZIEBUHR, J., SNIJDER, E. J. & GORBALENYA, A. E.** (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* 81: 853–879.
- 266. ZIEBUHR, J., THIEL, V. & GORBALENYA, A. E.** (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem* 276(35): 33220-33232.
- 267. ZUNIGA, S., CRUZ, J. L., SOLA, I., MATEOS-GOMEZ, P. A., PALACIO, L. & ENJUANES, L.** (2010). Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* 84(4): 2169-2175.
- 268. ZUNIGA, S., PASCUAL-IGLESIAS, A., SANCHEZ, C. M., SOLA, I. & ENJUANES, L.** (2016). Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Res* 226: 142-151.
- 269. ZUNIGA, S., SOLA, I., ALONSO, S. & ENJUANES, L.** (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* 78(2): 980-994.
- 270. ZUNIGA, S., SOLA, I., MORENO, J. L., SABELLA, P., PLANA-DURAN, J. & ENJUANES, L.** (2007). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357(2): 215-227.
- 271. ZUST, R., CERVANTES-BARRAGAN, L., KURI, T., BLAKQORI, G., WEBER, F., LUDEWIG, B. & THIEL, V.** (2007). Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog* 3(8): e109.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6747-2



9 178383511967472